

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



BESNOITIOSE BOVINA NUM EFETIVO LEITEIRO INFETADO ENDEMICAMENTE

CATARINA MARQUES ANASTÁCIO

ORIENTADOR(A):

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

TUTOR(A):

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



BESNOITIOSE BOVINA NUM EFETIVO LEITEIRO INFETADO ENDEMICAMENTE

CATARINA MARQUES ANASTÁCIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca Sampaio

VOGAIS:

Doutor George Thomas Stilwell
Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR(A):

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

TUTOR(A):

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Catarina Marques Anastácio

Título da Tese ou Dissertação: Besnoitiose bovina num efetivo leiteiro infetado endemicamente

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☒ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de julho de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:

Catarina Marques Anastácio

Agradecimentos

Começo por agradecer ao meu orientador, Doutor Ricardo Bexiga, por me ter aceitado como orientanda, pela proposta e oportunidade de realizar este projeto, por todos os conhecimentos transmitidos como professor e como orientador, pelas recomendações e por toda a atenção, disponibilidade e apoio durante a realização do estudo e redação da dissertação de mestrado.

Ao Doutor Alexandre Leitão, por todo o apoio neste projeto, pela cedência de material e de espaço no Laboratório de Saúde e Produção Animal Tropical da FMV-UL, imprescindível para a realização do estudo, pela disponibilidade que demonstrou para o esclarecimento de dúvidas, pelos conselhos e motivação, principalmente quando os obstáculos apareceram.

Aos produtores da exploração, que permitiram que a realização deste estudo fosse possível.

Ao Dr. Bruno Moreira, pelo fornecimento dos dados necessários.

Ao professor Dr. Telmo Nunes, pela disponibilidade e ajuda na análise estatística dos dados.

A toda a equipa do Laboratório de Saúde e Produção Animal Tropical. À Doutora Sofia Nolasco e à Ana, por toda a ajuda e perseverança nas culturas de células. À Dr.^a Sara Zúquete, pela disponibilidade, apoio no processamento das amostras e nos PCR e palavras de motivação. À Dr.^a Inês Delgado pela ajuda na obtenção das fotografias do teste de IFAT.

Ao meu tutor Dr. Dário Guerreiro e ao Dr. André Parada, um obrigado pelo estágio excecional, pela simpatia, confiança e por todas as oportunidades de aprendizagem proporcionadas. À Filipa, ao César e às minhas colegas de estágio, pela boa disposição e momentos partilhados.

Aos amigos que a faculdade me deu, estou grata por todos os momentos passados e memórias que irei levar para a vida. Agradeço às Pericats (Sofia, Julie, Martinho, Ferreira, Mafalda, Rita, Catarina, Maria Inês e Margarida) por todas as aventuras vividas e por tornarem esta caminhada única desde os primeiros dias neste percurso académico; à Sara, à Inês, à Diana, à Bia, à Matilde e à Beatriz pela confiança que depositaram em mim e amizade.

Aos meus amigos conterrâneos. Um agradecimento especial ao Miguel, à Maria, ao Cláudio, ao Gonçalo e à Ana Margarida pela sua amizade, paciência, momentos de diversão, conselhos e por terem sempre uma palavra amiga, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Por fim, e mais importante, agradeço a toda a minha família, sem eles não seria a Catarina que sou e não teria chegado onde cheguei. Não existem palavras para descrever a gratidão por tudo o que fizeram para que nada me faltasse, por todo o apoio, por terem acreditado em mim e por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos, mesmo nas maiores adversidades. Aos meus avós, por todo o carinho. Ao meu irmão, pela cumplicidade e alegria. Ao meu pai, por toda a força, apoio e proteção. À minha mãe, por toda a sua confiança em mim e nas minhas capacidades, pelas gargalhadas, desabafos e conselhos sábios, por me ensinar a ver o mundo de diferentes perspetivas e incentivar-me a ser uma melhor versão de mim.

A Deus e a todos o que me acompanharam nesta jornada, obrigado!

BESNOITIOSE BOVINA NUM EFETIVO LEITEIRO INFETADO ENDEMICAMENTE

Resumo

A besnoitiose bovina é causada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti* e é uma doença parasitária reemergente na Europa. Embora a maioria dos animais infetados permaneça assintomática, é uma doença crónica e debilitante, caracterizada por lesões cutâneas e formação de quistos nos tecidos, responsável por prejuízos económicos, sobretudo em áreas endémicas. No setor leiteiro, o impacto da doença na produção ainda é desconhecido.

O presente trabalho relata infeções e casos clínicos de besnoitiose bovina numa exploração leiteira em Portugal. O principal objetivo incidia na determinação do impacto da infeção por *Besnoitia besnoiti* na produção leiteira e na reprodução. O estudo foi desenvolvido numa exploração localizada no Alentejo Central, com cerca de 400 bovinos. Uma análise serológica foi realizada através de imunofluorescência indireta, em 262 animais com idade superior a um ano. Posteriormente, os animais foram clinicamente avaliados.

A prevalência real foi de 61,6% (145/262) nos animais testados, que aumentou para 65,7% (141/239) considerando apenas as vacas em produção. No exame clínico, 8% (16/211) dos animais apresentaram sinais clínicos crónicos de besnoitiose. O exame à conjuntiva e esclera evidenciou a presença de quistos patogénicos em 48% (46/96) das vacas. Os dados obtidos foram analisados através de uma regressão logística multivariada, considerando-se estatisticamente significativos os resultados $p < 0,05$. A idade representou um fator de risco para a infeção por *Besnoitia besnoiti* e os animais nascidos na exploração apresentaram maior risco de contrair a infeção relativamente a animais provenientes de explorações exteriores. A seropositividade e a presença de quistos escleroconjuntivais demonstraram estar associadas ao aumento da contagem de células somáticas no leite. Os animais com presença de quistos escleroconjuntivais apresentaram variações na produção média diária entre Julho e Março significativamente maiores. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, averiguou-se que os animais com lesões cutâneas evidentes produziram menos 605 litros na produção estimada aos 305 dias. Não foi possível determinar qualquer associação significativa entre os os dados reprodutivos e os resultados da serologia ou sinais clínicos.

A prevalência serológica e clínica determinadas na exploração indicam um cenário endémico e que a besnoitiose bovina continua a disseminar-se em Portugal e na Europa, não só em bovinos de carne, como também em explorações leiteiras. O estudo revela que a besnoitiose bovina pode ter um impacto económico considerável na produção leiteira. Assim, deve ser implementado um plano de controlo, baseado na vigilância da doença, no reforço de medidas de biossegurança e na divulgação de aspetos clínicos e biológicos junto de médicos-veterinários e produtores, sobretudo nas regiões onde a emergência é recente.

Palavras-Chave:

Besnoitia besnoiti, bovinos leiteiros, serologia, sinais clínicos, produção leiteira

BOVINE BESNOITIOSIS IN AN ENDEMICALLY INFECTED DAIRY CATTLE HERD

Abstract

Bovine besnoitiosis is caused by the apicomplexan protozoan *Besnoitia besnoiti* and is a re-emerging parasitic disease in Europe. Although most infected animals remain subclinically infected, this is a chronic and debilitating disease, characterized by skin lesions and thick-walled tissue cysts, responsible for severe economic losses, especially in endemic areas. In dairy production systems, the impact of the disease on herd efficiency remains unknown.

This work reports infections and clinical cases of bovine besnoitiosis in a dairy herd in Portugal. The main purpose of this study was to find the effect of *Besnoitia besnoiti* infection on reproductive and productive performances in dairy cows. The study was carried out on a dairy farm located in Central Alentejo, with about 400 animals. A serological screening was performed by immunofluorescence antibody test in 262 animals aged over one year. Subsequently, the animals were clinically examined.

The real overall prevalence was 61,6% (145/262), which increased to 65,7% (141/239) considering only the cows in production. On clinical examination, 8% (16/211) of the animals showed chronic clinical signs of besnoitiosis. The scleral conjunctivae inspection evidenced the presence of pathognomonic cysts in 48% (46/96) of the cows. The data obtained was analysed through multivariable logistic regression, considering the results $p < 0,05$ as statistically significant. Cattle's age represented a risk factor for infection by *Besnoitia besnoiti* and animals born on the farm had a higher risk of acquiring the infection comparing to those from outside farms. Seropositivity and the presence of sclera-conjunctival cysts revealed an association with an increase of milk somatic cell count. The cows with sclerocysts showed significantly greater variations in the average daily milk production between July and March. Although not statistically significant, chronically infected cows presented a decrease of 605 litres at mature equivalent milk yield. It was not possible to determine any significant association between the reproductive data and the serological results or clinical signs.

The serological and clinical prevalence determined in the herd indicate an endemic scenario. Bovine besnoitiosis continues to spread in Portugal and Europe, not only in beef cattle, but also in dairy cattle herds. The study reveals that bovine besnoitiosis may have a considerable economic impact on dairy production. Therefore, a control program must be implemented, based on disease surveillance, reinforcement of biosecurity measures and providing information about clinical and biological aspects of bovine besnoitiosis among veterinarians and farmers, especially in areas where the emergency is recent.

Keywords:

Besnoitia besnoiti, dairy cows, serology, clinical signs, dairy production

Índice

1. Relatório de estágio	1
1.1. Componente clínica do estágio curricular.....	1
1.2. Componente laboratorial do estágio curricular	2
2. Introdução	3
3. Revisão bibliográfica	3
3.1. Besnoitiose bovina e agente etiológico	3
3.2. Aspetos históricos.....	5
3.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal	7
3.4. Ciclo biológico	8
3.4.1. Hospedeiros Intermediários	9
3.4.2. Hospedeiros Definitivos	10
3.5. Epidemiologia.....	11
3.5.1. Fatores de risco	11
3.5.2. Transmissão	14
3.6. Patogenia, Quadro clínico e Lesões.....	16
3.6.1. Fase aguda.....	16
3.6.2. Fase crónica	18
3.6.3. Diagnósticos diferenciais	20
3.7. Resposta imunitária.....	21
3.8. Impacto económico	22
3.9. Diagnóstico	23
3.9.1. Métodos diretos.....	24
3.9.2. Métodos indiretos	26
3.10. Tratamento.....	29
3.11. Prevenção e controlo	30
4. Objetivos do estudo.....	33
5. Material e métodos	33

5.1.	Descrição da exploração e da área geográfica	33
5.2.	Caracterização da amostra	34
5.3.	Recolha de amostras para serologia.....	34
5.4.	Recolha de dados produtivos e individuais	34
5.5.	Imunofluorescência Indireta (IFAT)	36
5.5.1.	Produção de taquizoítos	36
5.5.2.	Purificação de taquizoítos	37
5.5.3.	Preparação de lâminas de IFAT.....	37
5.5.4.	Método de ensaio	38
5.6.	Exame clínico	39
5.7.	Análise estatística.....	39
6.	Resultados	43
6.1.	Caracterização serológica.....	43
6.1.1.	Prevalência aparente e prevalência real.....	43
6.1.2.	Resultados da prova de IFAT conforme a idade	43
6.1.3.	Resultados da prova de IFAT conforme o número de lactações e fase do ciclo produtivo	44
6.1.4.	Resultados da prova de IFAT conforme a origem.....	45
6.1.5.	Análise multivariada (regressão logística múltipla)	46
6.2.	Caracterização clínica.....	46
6.2.1.	Quistos na conjuntiva e esclera.....	46
6.2.2.	Sinais e lesões cutâneas.....	48
6.2.3.	Outros achados clínicos	49
6.2.4.	Análise multivariada	49
6.3.	Avaliação dos parâmetros produtivos do contraste leiteiro	50
6.3.1.	Produção média diária (kg)	51
6.3.2.	Variação da produção média diária (kg)	52
6.3.3.	Produção estimada aos 305 dias (kg).....	53

6.3.4.	Teor de gordura (%)	53
6.3.5.	Teor de proteína (%)	54
6.3.6.	Contagem de células somáticas (x1000 células/ml)	55
6.3.7.	Ureia (mg/Kg)	57
6.4.	Avaliação dos parâmetros reprodutivos.....	58
6.4.1.	Intervalo entre partos (dias)	58
6.4.2.	Número de inseminações artificiais até à concepção	59
6.4.3.	Historial de aborto e patologia reprodutiva	59
7.	Discussão	60
7.1.	Caracterização serológica.....	60
7.2.	Caracterização clínica.....	61
7.3.	Avaliação dos dados do contraste leiteiro e reprodutivos	62
7.4.	Sugestões para medidas de controlo.....	64
7.5.	Limitações do estudo e investigações futuras	66
8.	Conclusão	68
9.	Referências bibliográficas	69
10.	Anexos.....	76

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição mundial de infeções por <i>Besnoitia</i> spp. (adaptado de Álvarez-García et al. 2013).....	7
Figura 2– Distribuição geográfica de explorações seropositivas e seronegativas por freguesias e concelhos e cluster espacial da infeção por <i>B. besnoiti</i> em Portugal (adaptado de Waap 2015).....	8
Figura 3 – Ciclo de vida dos parasitas da subfamília Toxoplasmatinae. Circulo verde: parte do ciclo conhecida de <i>B. besnoiti</i> (adaptado de Robert-Gangneux and Dardé 2012)	9
Figura 4 – Vias de transmissão de <i>B. besnoiti</i> em bovinos (adaptado de Álvarez-García 2013).....	15
Figura 5 – Quistos no músculo e fáscias (adaptado de Gentile et al. 2012 e Langenmayer et al. 2015)	22
Figura 6 – Quistos após a compressão entre vidros (A); Quistos teciduais na pele (B) e proeminentes no lúmen dos vasos (seta) (C) (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a e Ryan et al. 2017).....	25
Figura 7 – Estrutura da parede de um quisto (A) (a: camada externa; b: camada interna; c: núcleo da célula hospedeira achatado) com bradizoítos (seta) (B) (adaptado de Diezma-Díaz 2019 e Cortes et. al 2004).....	25
Figura 8 – Taquizoítos de <i>B. Besnoiti</i> em culturas de células Vero (fotografia original).....	36
Figura 9 – Purificação de taquizoítos de <i>B. besnoiti</i> por centrifugação diferencial para obtenção de suspensão de antígeno para as lâminas de IFAT (figura original)	37
Figura 10 – Observação de um teste de imunofluorescência de um caso positivo de besnoitiose bovina em microscopia óptica com luz ultravioleta com ampliação de 400x (A); Observação dos parasitas com luz ultravioleta (verde) e marcação dos nucleos com DAPI (azul) na ampliação de 1000x (B) (fotografias originais).....	38
Figura 11 – Alterações dermatológicas da face e região periocular classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A,B e C) (fotografias originais)	40
Figura 12 – Alterações dermatológicas região do pescoço classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A, B e C); Espessamento evidente da pele (D) (fotografias originais).....	40
Figura 13 – Alterações dermatológicas nos quartos posteriores (fotografias originais).....	41
Figura 14 – Alterações dermatológicas no úbere classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A, B e C); Úbere com lesões cutâneas evidentes e escoriações (D) (fotografias originais) .	41
Figura 15 – Lesões nos cascos (A e B) e membros posteriores (C) (fotografias originais) ...	41
Figura 16 – Quistos na conjuntiva e esclera em quantidade crescente (fotografias originais)	42
Figura 17 – Presença de seborreia (fotografias originais)	42

Figura 18 – Presença de lesões nodulares evidentes na face e região do pescoço (fotografias originais).....	42
Figura 19 – Caso clínico de besnoitiose com claudicação de grau IV (fotografia original)	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Ciclo de vida e hospedeiros de <i>Besnoitia</i> spp. (adaptado de Olias et al. 2011)	4
Tabela 2 – Métodos de diagnóstico de besnoitiose bovina (adaptado de Diezma-Díaz 2019)	28
Tabela 3 – Resultados da prova de IFAT conforme a idade dos animais testados.....	43
Tabela 4 – Resultados da prova de IFAT conforme o número de lactação dos animais testados.....	44
Tabela 5 – Resultados da Resultados da prova de IFAT conforme a fase do ciclo produtivo.....	44
Tabela 6 – Resultados da Resultados da prova de IFAT conforme a origem	45
Tabela 7 – Regressão logística: resultado da prova de IFAT em função das variáveis idade, origem e fase do ciclo produtivo.....	46
Tabela 8 – Estatística descritiva (média, desvio padrão, mínimo e máximo) dos parâmetros da produção leiteira de acordo com o resultado serológico e presença de sinais clínicos	50
Tabela 9 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	51
Tabela 10 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	51
Tabela 11 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas	51
Tabela 12 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	52
Tabela 13 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	52
Tabela 14 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas.....	52
Tabela 15 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	53
Tabela 16 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais .	53
Tabela 17 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas.....	53

Tabela 18 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	54
Tabela 19 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	54
Tabela 20 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas	54
Tabela 21 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	55
Tabela 22 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	55
Tabela 23 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas	55
Tabela 24 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT...	56
Tabela 25 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	56
Tabela 26 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas	56
Tabela 27 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	57
Tabela 28 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	57
Tabela 29 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas.....	57
Tabela 30 – Estatística descritiva (média, desvio padrão, mínimo e máximo) dos parâmetros reprodutivos de acordo com o resultado serológico e presença de sinais clínicos	58
Tabela 31 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT	58
Tabela 32 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais	58
Tabela 33 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de alterações cutâneas.....	58
Tabela 34 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT...	59

Tabela 35 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos na esclera	59
Tabela 36 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas	59
Tabela 37 – Patologia reprodutiva conforme o estado serológico dos animais	59

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Casuística do estágio curricular (espécies)	1
Gráfico 2 – Casos clínicos acompanhados durante o estágio curricular.....	2
Gráfico 3 – Distribuição dos animais conforme a origem.....	35
Gráfico 4 – Distribuição dos animais conforme a idade (anos).....	35
Gráfico 5 – Distribuição dos animais conforme o nº de lactação e fase do ciclo produtivo	35
Gráfico 6- Seroprevalência conforme a idade.....	43
Gráfico 7 – Animais testados e seropositivos conforme a idade	44
Gráfico 8 – Animais testados e seropositivos conforme o número de lactações	45
Gráfico 9 – Animais testados e seropositivos conforme a fase do ciclo produtivo	45
Gráfico 10 – Resultados do exame à conjuntiva e esclera para pesquisa de quistos	47
Gráfico 11 – Resultados do exame à conjuntiva dos animais examinados no exame clínico geral conforme a idade	47
Gráfico 12 – Resultados do exame à conjuntiva dos animais examinados no exame clínico geral conforme o resultado serológico	47
Gráfico 13 – Classificação total das lesões cutâneas dos animais examinados	48
Gráfico 14 – Classificação total das lesões cutâneas dos animais examinados por idade....	48
Gráfico 15 – Classificação total dos sinais clínicos cutâneos dos animais examinados conforme o resultado serológico	49
Gráfico 16 – Animais seropositivos e seronegativos conforme a presença de outros achados clínicos.....	49

Lista de abreviaturas

AINES – Antiinflamatórios não esteroides

AST – Aspartato aminotransferase

B-MAT – *Besnoitia* -Teste de Aglutinação Direta Modificado (*Besnoitia-Modified Agglutination Test*)

BEN – Balanço energético negativo

BHB – Beta-hidroxibutirato

CK – Creatinina quinase

CO₂ – Dióxido de carbono

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

G – Gauge

GLDH – Glutamato desidrogenase

HD – Hospedeiro definitivo

HFF – Human foreskin fibroblasts

HI – Hospedeiro intermediário

IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*)

IA – Inseminação artificial

IC – Intervalo de confiança

IEP – Intervalo entre partos

IFAT – Immunofluorescence antibody test

Ig – Imunoglobulina

IFN- γ – Interferão-gama

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

Max. – Máximo

Min. – Mínimo

n – Número

NA – Não avaliado

OR – *Odds ratio*

p – probabilidade de significância

PBS – Tampão Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (*Real Time-Polimerase Chain Reaction*)

SBF – Soro Bovino Fetal

SNIRB – Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos

1. Relatório de estágio

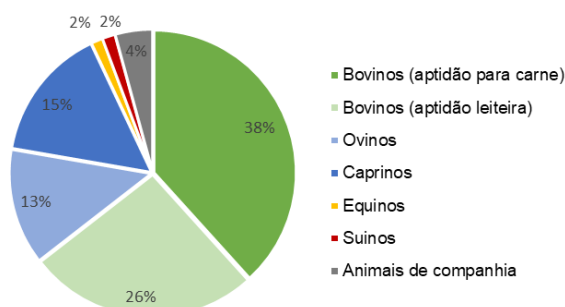
O estágio curricular foi repartido por duas partes: uma componente clínica em espécies pecuárias e uma componente laboratorial.

O tema do presente trabalho foi proposto pela orientação no período inicial da realização do estágio curricular na prática clínica, uma vez que a empresa onde a autora estagiou realizava a cada 2 meses visitas reprodutivas numa exploração leiteira com casos clínicos de besnoitiose bovina. Dado o interesse da autora pela área de doenças parasitárias e infecciosas, e também o apoio laboratorial disponibilizado, a mesma aceitou o desafio e escolheu desenvolver a sua dissertação de mestrado dentro do mesmo assunto.

1.1. Componente clínica do estágio curricular

A componente clínica foi realizada na empresa “Sá Guerreiro Vet Lda” sob a tutoria do Dr. Dário Guerreiro, na região da Península de Setúbal, Alentejo e Ribatejo, entre 31 de Agosto e 30 de Janeiro, perfazendo um total de 1100 horas. Esta empresa presta serviços de ambulatório de clínica, sanidade, reprodução e consultoria maioritariamente em explorações de bovinos, mas também apresenta casuística em pequenos ruminantes, equinos, suínos e animais de companhia.

Gráfico 1 – Casuística do estágio curricular (espécies)



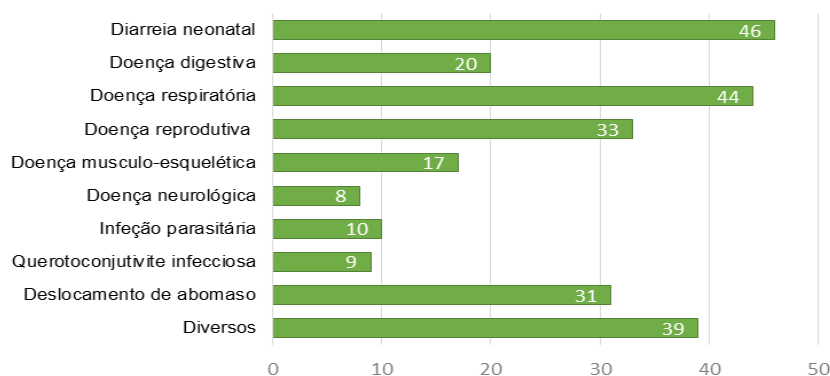
O estágio curricular teve como objetivo a aquisição de novos conhecimentos em clínica médica e cirúrgica, medicina preventiva, sanidade animal e manejo reprodutivo de ruminantes, no qual houve a oportunidade de acompanhar e colaborar em diversas atividades.

No âmbito da medicina preventiva e sanidade animal, foram realizadas desparasitações, vacinações e aconselhamento de planos profiláticos para a prevenção de variadas doenças, entre as quais clostridiose, doença respiratória bovina, diarreias neonatais, agalaxia contagiosa e doença da língua azul. Foi possível participar em saneamentos e testes de pré-movimentação em explorações de bovinos, em conjunto com os Serviços de Sanidade Animal (ADS/OPP) da Península de Setúbal e de outras regiões, através da colheita de sangue para despiste de brucelose e testes intradérmicos de tuberculinização, com respetiva leitura das reações de hipersensibilidade tipo IV, para testagem de tuberculose.

Na área clínica houve a oportunidade de acompanhar diversos casos clínicos, com a realização do exame clínico nos animais debilitados e respetiva discussão de diagnósticos

diferenciais e plano terapêutico, sendo abordadas doenças do foro digestivo (diarreia neonatal, parasitoses, timpanismo espumoso e gasoso, acidose, hipomotilidade ruminal), respiratório, musculoesquelético e podal (claudicações, lesões traumáticas, artrites, laminite, tiloma, panarício), neurológico (meningite neonatal, clostridiose, tétano, listeriose), doenças infecciosas (leptospirose, agalaxia contagiosa, queratoconjuntivite infecciosa, actinomicose), doenças metabólicas (cetose, toxemia de gestação), otites, mastites, doença cardíaca, entre outros. Algumas destas efemeridades foram diagnosticadas pós-morte, por necropsia. Prestou-se também auxílio em atos cirúrgicos, entre os quais piloropexia em deslocamento de abomaso à esquerda e à direita, cesarianas, correção de prolapsos uterinos e vaginais, orquiectomias, tratamento de feridas e drenagem de abscessos, e ainda em outros procedimentos, como descornas e corte corretivo de cascos.

Gráfico 2 – Casos clínicos acompanhados durante o estágio curricular



No controlo reprodutivo, através de visitas periódicas a explorações de bovinos de carne e leiteiros, procedeu-se ao diagnóstico de gestação por palpação transretal ou com recurso a ultrassonografia, assim como a avaliação do trato reprodutivo nas diferentes fases do ciclo produtivo das vacas, implementação protocolos hormonais para controlo do ciclo éstrico, e diagnóstico e terapêutica de doença reprodutiva (exemplos: retenção placentária, metrite, endometrite, quistos ovários). Em pequenos ruminantes os diagnósticos de gestação foram efetuados por ecografia transabdominal. Foi possível também realizar exames andrológicos em touros reprodutores e realizar assistência em partos distócicos tanto de bovinos como de pequenos ruminantes.

1.2. Componente laboratorial do estágio curricular

A componente laboratorial foi realizada numa fase posterior, entre 1 de Fevereiro a 13 de Maio no laboratório de Saúde e Produção Animal Tropical da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a supervisão do Doutor José Alexandre Leitão.

Foram efetuados procedimentos de cultura e manutenção de células Vero e HFF, propagação de *Besnoitia besnoiti* em linhas celulares e execução de diversos protocolos laboratoriais, entre os quais imunofluorescência indireta, extração de material genético por métodos alternativos e deteção de DNA através de PCR

2. Introdução

A besnoitiose bovina é uma doença parasitária cutânea, crónica e debilitante causada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti*. Os bovinos são o principal hospedeiro intermediário (HI). O hospedeiro definitivo (HD) permanece desconhecido. As vias de transmissão não estão totalmente esclarecidas, porém a disseminação do parasita pode ocorrer através de insetos hematófagos e por via iatrogénica (Bigalke 1968; Garrido-Castañé et al. 2019).

A mortalidade geralmente é baixa (<10%). A morbilidade pode atingir valores elevados (>80%), estando relacionada com a baixa condição corporal, diminuição da produção de leite e infertilidade das fêmeas e dos machos, o que leva ao refugo dos animais (Olias et al. 2011).

A doença tem carácter sazonal, existindo mais casos no verão (Álvarez-García et al. 2013). Apresenta repercussões a nível sistémico e cutâneo. Na fase aguda da doença estão presentes sinais clínicos inespecíficos (exemplos: hipertermia, anorexia, prostração). A apresentação crónica caracteriza-se pela presença de quistos nos tecidos, principalmente na esclera e mucosa vulvar, e de lesões cutâneas, como espessamento da pele, hiperqueratose e alopecia (Bigalke 1981). No entanto, a maioria das infeções são subclínicas (Bigalke 1968).

O impacto real da doença permanece desconhecido devido à falta de estudos de prevalência e incidência em áreas endémicas. O comércio de animais está envolvido na disseminação da besnoitiose bovina, contudo existem muitos aspetos epidemiológicos que precisam de ser investigados (Basso et al. 2011). Com o aumento notável do número de casos na Europa, a besnoitiose bovina foi classificada como doença reemergente (EFSA 2010).

Atualmente não existe no mercado europeu vacinas ou medicamentos eficazes. Assim, o controlo da besnoitiose bovina passa, essencialmente, pela proteção contra artrópodes, por um diagnóstico precoce, através de testes serológicos e de um exame clínico antes da introdução de novos animais, e pelo refugo dos animais infetados (Álvarez-García et al. 2013).

Até o momento, não há evidências de que os parasitas do género *Besnoitia* sejam zoonóticos (Olias et al. 2011), no entanto, é possível encontrar quistos nos músculos, fáscias e tecido conjuntivo intermuscular, tornando a carne imprópria para consumo (Villa et al. 2019).

3. Revisão bibliográfica

3.1. Besnoitiose bovina e agente etiológico
















O agente etiológico responsável pela besnoitiose bovina é o protozoário *Besnoitia besnoiti*, um parasita intracelular obrigatório. É uma coccidia formadora de quistos que pertence ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae e género *Besnoitia*. As espécies de *Besnoitia* são filogeneticamente próximas de outros parasitas, como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Hammondia* (Ellis et al. 2000; Cortes et al. 2014). O ciclo de vida destes parasitas é considerado heteroxeno (Pols 1960; Ferreira 1985).

São conhecidas dez espécies do género *Besnoitia*. Seis destas têm como HI pequenos mamíferos, tais como *B. neotomofelis*, *B. akadoni*, *B. jellisoni*, *B. wallacei* (roedores), *B. oryctofelisi* (lagomorfos) e *B. darlingi* (marsupiais e lagartos). O HD de *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi* e *B. wallacei* é o gato doméstico (Dubey and Yabsley 2010; Olias et al. 2011), e de *B. darlingi* é o gato e lince-vermelho (*Lynx rufus*) (Verma et al. 2017). As restantes espécies parasitam ungulados domésticos e silváticos (HI), entre as quais *B. besnoiti* (bovídeos), *B. bennetti* (equídeos), *B. caprae* (cabras), e *B. tarandi* (cervídeos). O HD destas espécies é desconhecido (Olias et al. 2011).

São conhecidos poucos fragmentos do genoma do parasita, pelo que as relações evolutivas entre as diferentes espécies de *Besnoitia* foram pouco investigadas. As sequências disponíveis codificam genes para o RNA ribossomal, tais como a região IST-1. Estas sequências que permitem diferenciar filogeneticamente as espécies que parasitam pequenos mamíferos das que parasitam ungulados, no entanto, não permitem a distinção da espécie ou estipe de *Besnoitia* de grandes mamíferos (Ellis et al. 2000; Olias et al. 2011). Para além da proximidade genética, existe uma grande semelhança no perfil antigénico entre *B. besnoiti*, *B. bennetti* e *B. tarandi*. É possível diferenciar estas espécies através de microssatélites (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a), da análise de proteínas por Western blot (Olias et al. 2011), da análise de isoenzimas por eletroforese (Jacquiet et al. 2010) e do seu comportamento biológico (Bigalke 1967).

Os isolados de *B. besnoiti* da Europa, Israel e Africa do Sul parecem apresentar comportamentos biológicos diferentes, sugerindo potenciais de virulência distintos (Bigalke 1968; Basson et al. 1970; Cortes et al. 2006c; Olias et al. 2011). O isolado de Africa do Sul, obtido a partir de gnus infetados, demonstrou ter menor virulência, visto que, em infeções experimentais de bovinos e coelhos, apenas foram observados sinais clínicos ligeiros (Bigalke 1968).

Tabela 1 – Ciclo de vida e hospedeiros de *Besnoitia* spp. (adaptado de Olias et al. 2011)

<i>Besnoitia</i> spp.	HI natural	HI natural	Ciclo de vida
<i>B. besnoiti</i>		?	?
<i>B. bennetti</i>		?	?
<i>B. tarandi</i>		?	?
<i>B. caprae</i>		?	?
<i>B. akodoni</i>		?	?
<i>B. jellisoni</i>		?	?
<i>B. oryctofelisi</i>		?	 (experimental)
<i>B. darlingi</i>			 (natural)  (experimental)
<i>B. wallacei</i>	?		 (experimental)
<i>B. neotomofelis</i>		?	

3.2. Aspetos históricos

Os primeiros casos de besnoitiose bovina foram descritos em França, nos Pirenéus, por Cadéac (1884) e por Besnoit e Robin (1912), e em Portugal, no Alentejo, por Franco e Borges (1916) (citados por Cortes et al. 2014). Dadas as dificuldades em identificar o agente etiológico, a besnoitiose bovina era também conhecida como globidiose cutânea bovina, sarcosporiose cutânea, elefantíase ou anasarca dos bovinos (Pols 1960; Bigalke 1981).

O parasita foi descoberto em França por Besnoit e Robin (1912), que observaram uma grande quantidade de quistos com inúmeros microrganismos semelhantes a esporos, na pele e tecido subcutâneo de bovinos infetados. Estes agentes patogénicos apresentavam muitas semelhanças com outras espécies de *Sarcocystis*, embora com algumas diferenças morfológicas (citado por Cortes et al. 2014).

Após a sua descoberta, a nomenclatura do parasita sofreu diversas alterações. Marotel (1912) verificou que este parasita nunca tinha sido descrito anteriormente em bovinos, propondo que esta espécie fosse designada por *Sarcocystis besnoiti* (citado por Pols 1960). Henry (1913) verificou que os quistos tinham uma morfologia distinta e que os esporos apresentavam formas com diferentes características dos sarcosporídeos, concluindo que o parasita não podia ser classificado como *Sarcocystis* (citado por Pols 1960). Franco e Borges (1916) descreveram detalhadamente observações macroscópicas e histológicas de casos clínicos de besnoitiose bovina em animais rejeitados no matadouro municipal de Lisboa, entre 1885 e 1914, em que a maioria dos animais afetados era proveniente do Alentejo. Nestas observações verificou-se que algumas das características morfológicas dos quistos, denominados de “areias”, permitiam diferenciar este novo parasita de outros do género *Sarcocystis*, sugerindo que fosse englobado num novo género, *Besnoitia*, sendo o agente etiológico designado de *Besnoitia besnoiti* (citado por Cortes et al. 2014).

Apesar dos primeiros casos terem sido descritos na Europa, acredita-se que a doença tenha origem em países tropicais e subtropicais do continente africano (Cortes et al. 2014). Em linha com isto, em Portugal, verificou-se que a doença estava presente em bovinos importados de Angola (Leitão 1949 citado por Álvarez-García et al. 2013). Com a difusão dos primeiros estudos e de novas informações acerca deste novo parasita, foram relatados vários casos de besnoitiose bovina em Africa, sendo diagnosticada pela primeira vez no Sudão por Benett (1928), seguida de Africa do Sul por Hofmeyr (1945) (citados por Pols 1960). Nos anos seguintes a doença estendeu-se por grande parte da Africa subsaariana. Nos países asiáticos, foram relatados os primeiros casos, em 1932, na Coreia do Sul (Fukushima 1932), e mais tarde, na China (Er-Hsiang, 1957), Cazaquistão (Khvan 1969) e Israel (Goldman and Pipano 1983) (citados por Waap 2015)

Na Europa, durante anos, a besnoitiose bovina esteve restrita aos Pirenéus e ao Alentejo (áreas endêmicas da doença). Desde os anos 90, a besnoitiose bovina tem adquirido uma importância económica crescente na Europa, devido ao aumento do número de casos e à sua expansão (Jacquiet et al. 2010). Novos casos foram reportados em Espanha (Juste et al. 1990), França (Bourdeau et al. 2004) e Portugal (Cortes et al. 2003) (citados por Waap et al. 2011). Nos últimos anos, foram descritos, em alguns países, vários surtos da doença associados ao comércio e movimentação de animais infetados a partir de áreas onde a doença é endémica, entre os quais Itália (Agosti et al. 1994), Alemanha (Schaes et al. 2009), Suíça (Lesser et al. 2012), Croácia (Beck et al. 2013), Hungria (Hornok et al. 2014) e Bélgica (Vanhoudt et al. 2015) (citados por Esteban-Gil et al. 2017). Na Irlanda, em 2015, esta doença foi diagnosticada pela primeira vez no território numa exploração leiteira endemicamente infetada, sem historial de importação de animais ou outros fatores de risco relevantes, cuja seroprevalência era de 68% (Ryan et al. 2016).

Com o número de casos crescente nas regiões endémicas e o aparecimento de novos surtos noutros países da Europa, em 2010, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) classificou a besnoitiose bovina como doença emergente (EFSA 2010).

A grande parte dos estudos publicados ao longo da história incide, sobretudo, em bovinos com aptidão para carne. No entanto, segundo alguns estudos epidemiológicos, esta doença está presente em bovinos leiteiros, principalmente em regiões enzoóticas africanas e asiáticas, em cuja apresentação subclínica é a mais frequente (Goldman and Pipano 1983 citado por Álvarez-García et al. 2013; Talafha et al. 2015). Na Europa estão também descritos alguns casos crónicos de besnoitiose bovina em explorações leiteiras (Alzieu et al. 2007 citado por Jacquiet et al. 2010; Freudiger et al. 2008 citado por Jacquiet et al. 2010; Liénard et al. 2011; Gentile et al. 2012; Ryan et al. 2016; Villa et al. 2019).

Com a obtenção dos primeiros isolados a partir de ungulados domésticos (bovinos) e selvagens (gnu e impala), provenientes de África do Sul, foi possível realizar as primeiras infeções experimentais em modelos *in vivo* (bovinos, roedores e lagomorfos) e culturas *in vitro* de *B. Besnoiti* (Pols 1960; Bigalke 1968; Basson et al. 1970), permitindo investigar aspetos relacionados com a sua transmissão, patogenia, imunidade, potenciais alvos terapêuticos, realizar estudos filogenéticos, e ainda desenvolver vacinas (Bigalke et al. 1974; Ellis et al. 2000; Cortes et al. 2006c, 2011).

Embora muitos aspetos relacionados com a patogénese e ciclo biológico deste protozoário não se encontrem esclarecidos, na última década destaca-se o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico (Schaes et al. 2013; García-Lunar et al. 2017), estudos de prevalência e incidência da doença em diversos territórios e o progresso no conhecimento da patogenia da besnoitiose bovina durante as fases aguda e crónica em infeções experimentais e naturais (Gollnick et al. 2015; Diezma-Díaz et al. 2018, 2019).

3.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

A besnoitose bovina foi descrita na África Subsariana (África do Sul, Suazilândia, Botsuana, Namíbia, Zimbábue, Angola, Congo, Quênia, Tanzânia, Uganda, Sudão, Camarões, Nigéria e Ruanda) (Pols 1960, Habarugira et al. 2019), Ásia (China, Coreia do Sul, Jordânia, Israel, Cazaquistão, Rússia e Uzbequistão) (Lee et al. 1970 citado por Jacquet et al. 2010), Europa (França, Portugal, Espanha, Itália, Alemanha, Suíça, Croácia, Hungria, Bélgica e Irlanda) e América do Sul (Venezuela) (Vogelsang and Gallo 1941 citado por Jacquet et al. 2010) (Figura 1).

É uma doença reemergente na Europa (EFSA 2010; Cortes et al. 2014) e endêmica em regiões tropicais e subtropicais de África (Chatikobo et al. 2013). Na Ásia, vários relatórios sugerem uma ocorrência enzoótica no Cazaquistão, Uzbequistão, China e Coreia do Sul, no entanto, não há informações atuais sobre estes países (Olías et al. 2011).

Na Europa, a besnoitose bovina é endêmica em Portugal, França (Pirenéus, Maciço Central e Alpes franceses) (Jacquet et al. 2010), Espanha (centro, noroeste, Pirenéus, e na fronteira com o Alentejo) (Cortes et al. 2014) e Itália (norte e centro) (Gentile et al. 2012).

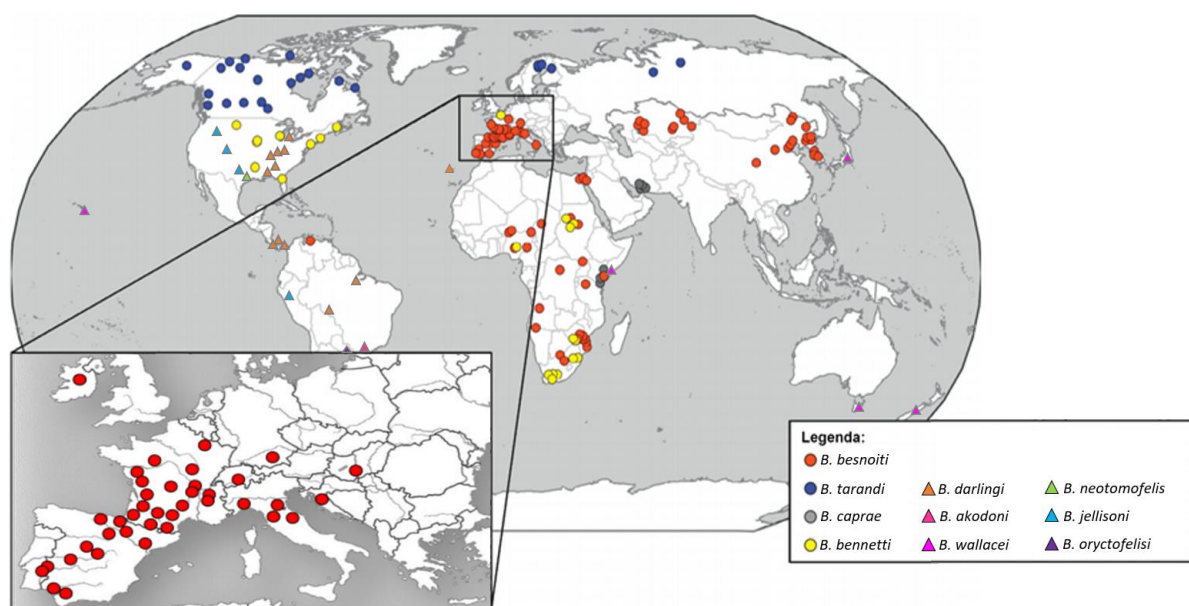


Figura 1 – Distribuição mundial de infecções por *Besnoitia* spp. (adaptado de Álvarez-García et al. 2013)

Em Portugal, a maioria dos casos clínicos de besnoitose bovina foram reportados no Alentejo. Os primeiros casos fora desta região foram confirmados em 2014, em cinco efetivos no norte do país, junto à fronteira com Espanha, e em duas explorações na zona centro (Figura 2; Waap et al. 2014). Em 2014, um estudo epidemiológico determinou que a prevalência de efetivos infetados no país era de 5,1%, em que todas as explorações positivas tinham bovinos com aptidão para carne. A seroprevalência intraexploração média era de 33%, apesar de metade das explorações testadas apresentar valores menores que 10,4% (Waap et al. 2014).

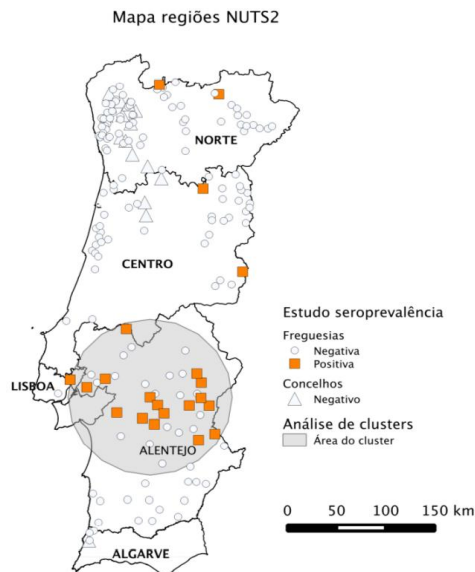


Figura 2– Distribuição geográfica de explorações seropositivas e seronegativas por freguesias e concelhos e *cluster* espacial da infecção por *B. besnoiti* em Portugal (adaptado de Waap 2015)

3.4. Ciclo biológico

O ciclo de vida de *B. besnoiti* permanece desconhecido. Como este protozoário é uma coccidia formadora de quistos, o seu ciclo de vida é considerado heteroxeno, envolvendo, à semelhança de outras coccídias, um HI, onde ocorre a fase assexuada do ciclo, e um HD, onde se dá a multiplicação sexuada do parasita (Figura 3; Ferreira 1985; Basso et al. 2011).

O HI ingere oocistos esporulados, que contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos disseminam-se no organismo por via sanguínea e invadem células endoteliais, monócitos, histiócitos, neutrófilos e células de Sertoli, onde se multiplicam por endodiogenia (multiplicação assexuada), dando origem a taquizoítos com 6-7,5×2,5-3,9 μm . Os taquizoítos são formas de multiplicação rápida do parasita, que, posteriormente causam lise celular e invadem outras células, sucessivamente, até darem origem a bradizoítos com 6-7,5×1,9-2,3 μm , através da multiplicação por endodiogenia. Os bradizoítos estão presentes em quistos nos tecidos. Cada quisto contém cerca de 200.000 bradizoítos e envolve células do hospedeiro, como fibroblastos, miofibroblastos e histiócitos do tecido subcutâneo, pele, esclera e mucosa vestibulo-vaginal (Pols 1960; Bigalke 19681; Ferreira 1985; Cortes et al. 2014). Tanto os taquizoítos como os bradizoítos têm a capacidade infetante para outros HI suscetíveis (Bigalke 1968; Basson 1970).

O HD ingere tecidos do HI infetados com quistos (bradizoítos). Os bradizoítos penetram nas células do epitélio intestinal e multiplicam-se por esquizogonia (multiplicação assexuada) e gametogonia (multiplicação sexuada), dando origem a oocistos não esporulados. Embora não tenham sido observados, presume-se que os oocistos sejam semelhantes aos de outras espécies de *Besnoitia*, com diâmetro de 10 a 14 μm (Dubey et al. 2003). No exterior, em condições favoráveis, os oocistos sofrem esporogonia, formando esporocistos, que contêm esporozoítos, infetantes para o HI (Pols 1960; Ferreira 1985).

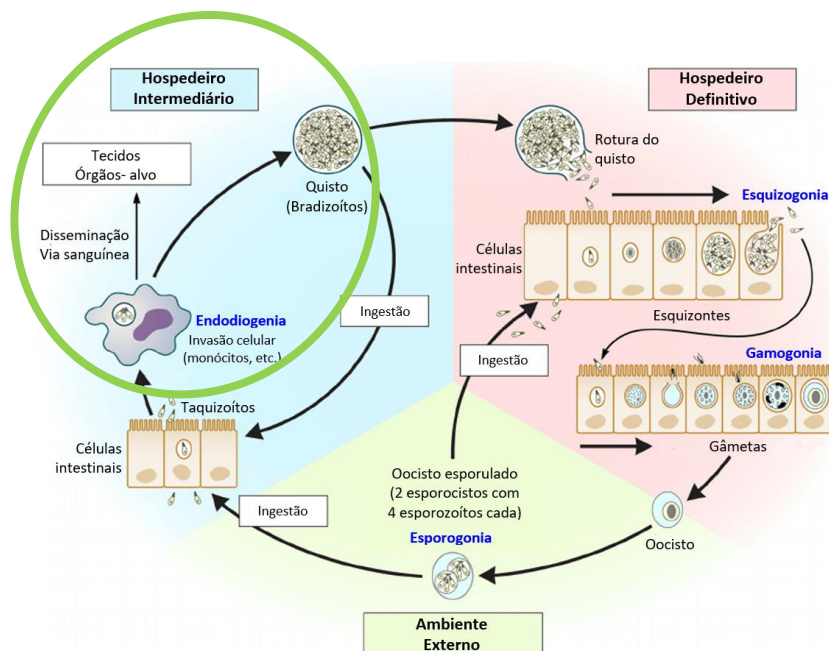


Figura 3 – Ciclo de vida dos parasitas da subfamília Toxoplasmatinae. Círculo verde: parte do ciclo conhecida de *B. besnoiti* (adaptado de Robert-Gangneux and Dardé 2012)

3.4.1. Hospedeiros Intermediários

Os bovinos, impalas (*Aepyceros melampus*), cudos (*Tragelaphus strepsiceros*) e gnus (*Connochaetes taurinus*) são HI da infecção natural de besnoitiose bovina (Pols 1960; Bigalke 1968; Seltsmann et al. 2020). Outros ruminantes silváticos ou mesmo roedores podem atuar como reservatórios, tal como se verifica noutras espécies de *Besnoitia* (Basso et al. 2011; Álvarez-García et al. 2013; Seltsmann et al. 2020).

Os cervídeos têm um papel no ciclo biológico de *B. besnoiti* e podem também atuar como HI, uma vez que foi descrito um caso de besnoitiose bovina numa corça jovem (*Capreolus capreolus*) (Arnal et al. 2016). Nesta espécie e num veado-vermelho (*Cervus elaphus*) foram detetados anticorpos contra *B. besnoiti* em áreas endémicas. As baixas prevalências encontradas evidenciam que os ruminantes silvestres não parecem ter um papel relevante na transmissão de *B. besnoiti* para os bovinos (Gutiérrez-Expósito et al. 2016a).

Existe ainda uma grande variedade de espécies suscetíveis à infecção experimental, incluindo coelhos, porquinhos-da-índia, ovelhas, cabras (Pols 1960), gerbilos (Shkap et al. 2002) e roedores (Schares et al. 2009; Basso et al. 2011). Os coelhos são altamente suscetíveis à infecção experimental por *B. besnoiti* de isolados bovinos, tanto com taquizoítos como com bradizoítos, sendo possível reproduzir sinais clínicos agudos e crónicos, semelhantes aos dos bovinos, e ainda desenvolver uma resposta imunitária forte (Pols 1960; Bigalke 1968; Basson 1970). Apesar disso, nenhum caso de infecção natural por *B. besnoiti* foi reportado nestas espécies (Jacquiet et al. 2010; Basso et al. 2011).

Os pequenos ruminantes, apesar de suscetíveis à infecção experimental, não parecem estar envolvidos no ciclo biológico natural do protozoário, pois não foram detetados anticorpos contra *B. besnoiti* em áreas endémicas (Gutiérrez-Expósito et al. 2016b).

3.4.2. Hospedeiros Definitivos

O HD de *B. besnoiti* ainda não foi identificado, mas suspeita-se que seja um carnívoro do continente africano, onde possivelmente surgiu a doença (Fernandez-Garcia et al. 2021).

Uma variedade de mamíferos das famílias Felidae, Canidae, Viverridae e Herpestidae, aves Corvidae e Ciconiidae, e répteis Columbridae e Viperidae foram submetidos a infecções experimentais, mas apenas se verificou excreção de oocistos (Peteshev et al. 1974 citado por Diesing et al. 1988) ou seroconversão em gatos (Diesing et al. 1988; Basso et al. 2011).

A hipótese do gato ser o HD de *B. besnoiti* foi postulada após a detecção de oocistos nas fezes de três gatos alimentados com tecidos de bovinos cronicamente infetados. Estes oocistos foram eliminados entre 13 a 16 dias após a infecção, durante um curto período de 3 a 6 dias, e tiveram a capacidade de reproduzir a infecção em roedores, ovinos, caprinos e num vitelo (Peteshev et al. 1974 citado por Diesing et al. 1988). Contudo, não foram realizadas provas moleculares ou serológicas para confirmar a presença de *B. besnoiti*. Em infecções experimentais mais recentes não foram detetados quaisquer oocistos nas fezes, embora alguns gatos alimentados com bradizoítos tenham desenvolvido anticorpos específicos 5 a 7 semanas após a infecção, detetados por IFAT e confirmados por WB, existindo a possibilidade desta espécie intervir no ciclo biológico de *B. besnoiti* (Diesing et al. 1988; Basso et al. 2011). Para além disso, o gato foi identificado como HD de outras espécies de *Besnoitia* com ciclo de vida conhecido: *B. wallacei* (Wallace and Frenkel 1975), *B. oryctofelisi* (Dubey et al. 2003), *B. darlingi* (Smith and Frenkel 1977) e *B. neotomofelis* (Dubey and Yabsley 2010). Os gatos domésticos experimentalmente infetados com *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi* e *B. darlingi* eliminavam uma quantidade reduzida de oocistos, mesmo quando alimentados com um grande número de tecidos com quistos, o que pode indicar uma transmissão ineficiente por oocistos, a existência de outros HD ou outras vias de transmissão mais eficientes entre os hospedeiros (Dubey and Yabsley 2010; Olias et al. 2011).

Por outro lado, a infecção de um HD carnívoro através da ingestão de tecidos infetados de bovinos parece pouco provável, visto que os bovinos são animais difíceis de predar, devido ao seu porte, e os seus cadáveres são recolhidos regularmente e incinerados, não ficando acessíveis a potenciais HD com hábitos alimentares necrófagos (Cortes et al. 2005, 2014).

Este protozoário pode ter um ciclo silvático mais específico e envolver outros hospedeiros. Neste caso, os bovinos poderão atuar como um hospedeiro accidental e apresentar uma reação exagerada ao parasita (Basso et al. 2011; Selmann et al. 2020).

Existe ainda a hipótese de outros felídeos silvestres, como o leão (*Panthera leo*), estarem envolvidos no ciclo biológico num contexto silvático, podendo ser um dos possíveis HD desta coccidia, dado que foram encontrados leões seropositivos na Namíbia (Selmann et al. 2020). Em linha com isso, foram encontrados oocistos de uma espécie de *Besnoitia* não

descrita anteriormente, em fezes de duas chitas (*Acinonyx jubatus*) no continente africano, cujo HI é desconhecido (Schaes et al. 2021).

Várias hipóteses relativamente à intervenção das raposas (*Vulpes vulpes*) no ciclo biológico foram postuladas, uma vez que foi detetado DNA filogeneticamente semelhante a *B. besnoiti* em fezes de cadáveres de raposas, na região oeste de Espanha (González-Barrio et al. 2021). Porém, a baixa prevalência encontrada sugere uma relevância limitada das raposas na epidemiologia de *B. besnoiti*, para além de não terem sido encontrados anticorpos específicos em estudos anteriores nesta espécie (Waap 2015; González-Barrio et al. 2021).

3.5. Epidemiologia

A seroprevalência, juntamente com o tipo e gravidade dos sinais clínicos, permite caracterizar epidemiologicamente um efetivo, bem como realizar uma análise de risco (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

Em explorações endémicas, a prevalência clínica varia entre 1 e 10%. Em surtos, os sinais clínicos são de maior severidade e a prevalência clínica pode variar entre 15 e 40% (Jacquiet et al. 2010, Liénard et al. 2011, Álvarez-García et al. 2013). Estima-se que nesta situação a doença seja sub-diagnosticada, uma vez que o quadro clínico pode ser confundido com outras afeções (Waap 2015).

A seroprevalência em áreas enzoóticas é cerca de 50% (Álvarez-García et al. 2013), mas em áreas epizooticas e explorações recentemente infetadas pode atingir valores mais elevados (>80%) num curto intervalo de tempo (14 meses a 3 anos). A maioria dos animais desenvolve infeção subclínica (Bigalke 1968; Liénard et al. 2011; Cortes et al. 2014).

Os animais subclínicamente infetados e os recuperados podem tornar-se resistentes a reinfeções, mas acredita-se que sejam portadores para toda a vida, representando uma fonte importante de infeção (Álvarez-García et al. 2013; Frey et al. 2013; Gollnick et al. 2015).

A entrada de animais portadores é a principal causa de introdução de besnoitiose bovina num efetivo indemne e, através do comércio, estes podem facilmente ser introduzidos noutras explorações, podendo disseminar o parasita não só entre manadas como também atravessar fronteiras (Álvarez-García et al. 2013; Cortes et al. 2014).

3.5.1. Fatores de risco

Os fatores de risco associados à introdução da besnoitiose bovina estão essencialmente associados aos diferentes sistemas de produção, movimentação animal e às condições edafoclimáticas (Álvarez-García et al. 2013).

A idade demonstrou ser o único fator de risco individual determinante no desenvolvimento da doença (Bigalke 1968; Álvarez-García et al. 2014a)

3.5.1.1. Fatores individuais

O aumento da idade dos animais está associado ao aumento da seroprevalência (Bigalke 1968; Álvarez-García et al. 2014a; Villa et al. 2019). A incidência clínica da doença é mais elevada em animais entre os 3 e 6 anos (Bigalke 1968). Este facto pode estar associado com alterações do sistema imunitário ou com características associadas ao comportamento dos animais (exemplo: animais mais jovens têm maior amplitude de movimentos, que permite defender das picadas dos insetos), que podem predispor a outras formas de transmissão e, consequentemente, a diferentes doses infetantes (Esteban-Gil et al. 2017).

Nos animais jovens, com menos de um ano de idade, a incidência da doença é muito baixa (Bigalke 1968), o que indica que o risco de exposição aumenta com o tempo de permanência no efetivo, mas também que a transmissão e progressão da doença são relativamente lentas (Álvarez-García et al. 2013; Talafha et al. 2015; Ryan et al. 2016). Outra possibilidade poderá ser a presença de anticorpos maternos adquiridos através do colostro de vacas seropositivas, que persistem aproximadamente 6 a 8 meses e podem ser um fator protetor contra a infeção (Shkap et al. 1994; Hornok et al. 2015). No entanto, o risco de transmissão aumenta com a coabitação com outros animais infetados, pelo que pode ocorrer a infeção em vitelos. Estão descritos casos clínicos crónicos de besnoitiose bovina em animais com menos de 6 meses de idade (Bigalke 1968; Hornok et al. 2015; Diezma-Díaz et al. 2017).

O sexo dos animais não é considerado um fator de risco, pois a seroprevalência parece ser semelhante em ambos os sexos. No entanto, os machos parecem ser mais afetados, visto que apresentam sinais clínicos mais evidentes e facilmente detetáveis (Jacquiet et al. 2010; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Os touros reprodutores têm ainda um maior risco de adquirir e transmitir o parasita devido ao acasalamento com elevado número de fêmeas durante a época reprodutiva por contacto direto (Álvarez-García et al. 2014).

A raça não demonstrou ser um fator predisponente. Apesar de serem detetados mais casos clínicos e/ou seropositivos em bovinos de carne, é mais provável que estas diferenças tenham maior relação com os sistemas de produção e respetivas práticas de manejo (Bason 1970; Álvarez-García et al. 2013; Waap et al. 2014). Em regiões endémicas, como os Alpes franceses, Freudiger (2008) verificou-se que os bovinos leiteiros e os bovinos com aptidão para carne eram igualmente suscetíveis à infeção (citado por Jacquiet et al. 2010).

3.5.1.2. Regime produtivo e práticas de manejo

A exposição ao parasita é mais frequente em animais criados em regime extensivo, uma vez que existem mais fatores de risco, tais como a monta natural e a partilha de pastagens com bovinos de outras explorações, que facilitam a transmissão por contacto direto (Garrido-Castañé et al. 2019). Existe uma maior exposição a artrópodes e animais silváticos que possam ter um papel no ciclo biológico do parasita (Gutiérrez-Expósito et al. 2016a).

O tamanho do efetivo tem influência na distribuição da doença, tendo sido demonstrado que efetivos de maiores dimensões têm seroprevalências mais elevadas (Waap et al. 2014; Talafha et al. 2015). A disseminação do parasita intraexploração é favorecida por condições de manejo mais intensivas (maior densidade animal), quando os animais coabitam em contato próximo por longos períodos (Gollnick et al. 2015; Esteban-Gil et al. 2017).

As práticas de manejo são determinantes na introdução e disseminação do agente. A limpeza frequente das instalações parece ser um fator protetor contra a infecção por *B. besnoiti*, na medida em que a remoção de fezes e dejetos contribui para a menor atração de insetos. (Talafha et al. 2015). A partilha de utensílios (exemplo: agulhas hipodérmicas) e a movimentação de trabalhadores entre explorações vizinhas também representam um fator de risco para a introdução do agente patogénico (Talafha et al. 2015).

3.5.1.3. Transumância

O movimento de animais entre explorações representa um fator de risco de introdução de *B. besnoiti* num efetivo (Bigalke 1968). Num surto resultante da introdução de um animal portador, principalmente com infecção subclínica, a maioria dos animais pode tornar-se seropositivo num curto espaço de tempo (Liénard et al. 2011). Por outro lado, um animal seronegativo introduzido numa exploração endemicamente infetada pode desenvolver um quadro clínico grave ou mesmo fatal (Cortes et al. 2005).

A partilha de pastagens entre efetivos constitui uma prática de risco. Quando o contacto próximo entre animais de diferentes efetivos é limitado, a doença raramente é encontrada em explorações vizinhas, dado o curto tempo de sobrevivência do parasita em vetores mecânicos (Bigalke 1968).

3.5.1.4. Condições edafoclimáticas

As condições edafoclimáticas, nomeadamente a temperatura, precipitação, altitude e vegetação, têm influência na distribuição de artrópodes (Liénard et al. 2011). Para além disso, nas últimas décadas, as alterações climáticas têm favorecido o aumento de insetos vetores, potencialmente facilitando a transmissão de agentes patogénicos como *B. besnoiti* (Waap 2015).

As ocorrências clínicas verificam-se durante todo o ano, contudo, a besnoitiose bovina tem um carácter sazonal. A maioria das novas infeções e casos clínicos (80-90%) ocorrem durante o verão, em climas temperados, ou nos meses quentes e húmidos, em regiões tropicais e subtropicais, que coincide com o pico de atividade de artrópodes (Bigalke 1981; Waap et al. 2014; Hornok et al. 2015). As ocorrências nos meses mais frios resultam possivelmente do diagnóstico tardio das infeções no final do verão, quando aparecem os primeiros sinais de cronicidade característicos (Álvarez-García et al. 2013; Waap 2015). No inverno os níveis de anticorpos são mais baixos, e poderá verificar-se um baixo número de

seroconversões negativas, sugerindo que a transmissão contínua do parasita por artrópodes pode ser necessária para manter altos níveis de anticorpos (Liénard et al. 2011).

A altitude representa também um fator de risco, visto que o contacto próximo entre os animais é favorecido em regiões montanhosas, para além de existir maior exposição a reservatórios e insetos hematófagos (Álvarez-García et al. 2014a).

3.5.2. Transmissão

As vias de transmissão de *B. besnoiti* não estão totalmente clarificadas. Foram comprovadas experimentalmente apenas a transmissão mecânica por dípteros hematófagos e iatrogénica através de agulhas hipodérmicas (Bigalke 1968). As doses infetantes necessárias para causar infeção não estão determinadas, mas, nas vias de transmissão mencionadas, presume-se que sejam relativamente baixas (Basso et al. 2011).

A introdução de bovinos infetados em efetivos indemnes é crucial para sua disseminação entre explorações (Bigalke 1968). Os animais com sinais clínicos apresentam elevadas cargas parasitárias nos tecidos e um alto risco de transmissão do parasita na exploração. Porém, a maioria apresenta-se subclínicamente infetada, sendo reservatórios com bastante importância (Gollnick et al. 2015; Frey et al. 2013; Villa et al. 2019).

O principal modo de transmissão do parasita parece ser horizontal, por contacto direto ou indireto (Figura 4; Basso et al. 2011; Álvarez-García et al. 2013).

A transmissão por contacto direto entre animais ocorre através da monta natural (Gutiérrez-Expósito et al. 2017b), lambidelas (Cortes et al. 2014) ou por soluções de continuidade da pele (feridas e lacerações). Uma vez que os quistos estão localizados nas camadas mais superficiais das mucosas do trato reprodutivo (Kumi-Diaka et al. 1981), nasofaríngea e da derme (Dubey et al. 2013; Langenmayer et al. 2015), aquando a sua rotura, os bradizoítos são facilmente expostos a animais suscetíveis. Estas formas parasitárias têm a capacidade de atravessar barreiras mucosas (Bigalke 1968). No entanto, o contacto próximo dos animais durante a monta natural parece ter importância limitada na transmissão de *B. besnoiti* (Hornok et al. 2015).

O parasita pode ser transmitido indiretamente por dípteros, que atuam como vetores mecânicos. Este modo de transmissão parece ser a principal via de infeção natural da besnoitiose bovina. Os dípteros hematófagos relevantes são os tabanídeos (*Atylotus nigromaculatus*, *Tabanocella denticornis* e *Haematopota albihirta*), moscas-do-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) e glossinas (*Glossina brevipalpis*), que adquirem o parasita a partir de animais com infeção aguda, por via sanguínea, ou de animais cronicamente infetados, por via transcutânea (Pols 1960; Bigalke 1968; Olias et al. 2011). Estes insetos possuem peças bucais fortes e grandes o suficiente para conseguirem perfurar os quistos em regiões anatómicas de fácil acesso. Após a refeição, os parasitas mantêm a sua infecciosidade no vetor durante um intervalo de tempo limitado, parecendo portanto improvável, a transmissão

por vetores em longas distâncias. Para uma transmissão eficaz é necessário que o hospedeiro infectado e o animal suscetível sejam submetidos a um elevado número de picadas, sendo este cenário possível nos meses mais quentes (Bigalke 1968; Sharif et al. 2019). Para além disso, estes artrópodes, particularmente os tabanídeos, têm um comportamento alimentar oportunista, podendo transmitir *B. besnoiti* entre potenciais reservatórios silváticos e bovinos domésticos (Álvarez-García et al. 2013). Existe ainda a possibilidade de algumas moscas secretófagas (*Musca domestica* e *Musca autumnalis*) atuarem como vetores mecânicos, uma vez que foram observados taquizoítos em secreções lacrimais, facilmente acessíveis a estes dípteros (Bigalke 1968; Cortes et al 2003; Hornok et al. 2015).

À semelhança de outras coccídias formadoras de quistos, os bovinos poderão infectar-se com *B. besnoiti* por ingestão de oocistos excretados por um HD, desconhecido até à data. Assim, ainda não foi possível comprovar esta via de transmissão (Ferreira 1985; Basso et al. 2011). Estas formas parasitárias possivelmente são resistentes no meio ambiente, tal como os oocistos de *T. gondii* e *N. caninum* (Álvarez-García et al. 2013).

A transmissão vertical por via transplacentária ou por rotura de quistos da mucosa do trato reprodutivo durante o parto parece improvável, visto que os vitelos de mães seropositivas geralmente não estão infectados (Hornok et al. 2015). A transmissão por colostro foi descartada, uma vez que foi comprovada a ausência de DNA de *B. besnoiti* no colostro de vacas infectadas (Hornok et al. 2015).

Apesar do tropismo para o trato reprodutivo masculino, a transmissão através de sémen é improvável, pois não foi identificado DNA do protozoário no ejaculado de touros infectados, mesmo com sinais crónicos evidentes (Kumi-Diaka et al. 1981; Esteban-Gil et al. 2014).

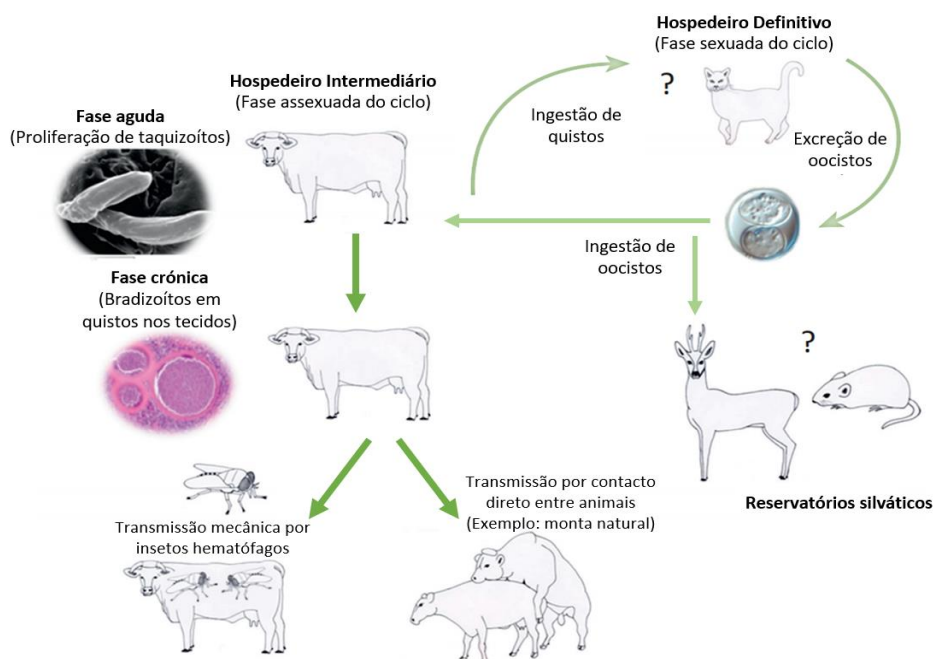


Figura 4 – Vias de transmissão de *B. besnoiti* em bovinos (adaptado de Álvarez-García 2013)

3.6. Patogenia, Quadro clínico e Lesões

O período de incubação é curto, entre 6 a 15 dias (Bigalke 1968), no entanto, pode ser mais prolongado, até 2 meses (Álvarez-García et al. 2013). Em infecções experimentais, os primeiros sinais clínicos podem manifestar-se em menos de dois dias (Bigalke 1968; Diezma-Díaz et al. 2018). Este intervalo de tempo varia de acordo com o estado imunitário do hospedeiro e com a forma e a via de inoculação do parasita, sendo mais curto com a inoculação de taquizoítos por via endovenosa e mais longo com bradizoítos por via intradérmica (Diezma-Díaz et al. 2019). Estes fatores influenciam a severidade e duração dos sinais clínicos (Diesing et al. 1988; Diezma-Díaz et al. 2019).

A besnoitiose bovina desenvolve-se em 3 fases: aguda, subaguda e crónica (Anexos 1 e 2). A fase aguda caracteriza-se pela multiplicação rápida do parasita (taquizoítos) nas células endoteliais. Na fase subaguda, que decorre entre o fim da fase aguda e o aparecimento dos primeiros quistos maduros, verifica-se o desenvolvimento de quistos jovens (100-300µm). A fase crónica desenvolve-se após a recuperação clínica dos animais da doença aguda. Nesta fase ocorre a multiplicação lenta do parasita (bradizoítos) em quistos (Basson et al. 1970; Cortes et al. 2014; Ryan et al. 2016). A duração destas fases é variável (Gollnick et al. 2015).

A besnoitiose bovina aguda pode apresentar dois quadros clínicos: síndrome febril e anasarca. A fase crónica caracteriza-se por esclerodermia, hiperqueratose, hiperpigmentação e alopecia (Pols 1960; Cortes et al. 2005). Geralmente os casos são clinicamente diagnosticados nesta fase. No entanto, a maioria dos animais infetados apresenta um quadro subclínico, e alguns bovinos infetados cronicamente parecem melhorar parcialmente ou mesmo totalmente (Bigalke 1968; Jacquiet et al. 2010).

A mortalidade pode ocorrer tanto na fase aguda como na crónica (Pols 1960).

3.6.1. Fase aguda

3.6.1.1. Síndrome febril

A primeira fase da besnoitiose bovina tem a duração de 2 a 10 dias e é caracterizada por uma síndrome febril com sinais clínicos inespecíficos. A hipertermia presente nesta fase está associada à proliferação e multiplicação de taquizoítos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, macrófagos, fibroblastos, células mononucleares, células de Sertoli e hepatócitos. Após a invasão celular, os parasitas ocupam uma região do citoplasma, o vacúolo parasitóforo, rodeada por uma membrana. No vacúolo parasitóforo dá-se a multiplicação dos parasitas, que provocam lise celular. Os parasitas são libertados para a corrente sanguínea e, posteriormente, infetam outras células hospedeiras, repetindo este ciclo (Pols 1960; Ferreira 1985; Schares et al. 2009). Por vezes surgem infiltrados inflamatórios de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos na parede dos vasos afetados (Frey et al. 2013)

Nesta fase é possível verificar parasitemia. Os parasitas são detetados em esfregaços sanguíneos 4 a 12 dias após o início da reação febril (Anexo 1; Bigalke 1981).

A proliferação do parasita causa alteração da permeabilidade vascular e danos nas células endoteliais dos vasos, principalmente nas veias de pequeno e médio calibre (exemplos: veias das extremidades e faciais) e em algumas artérias e arteríolas da pele e testículos, onde se verificam lesões de vasculite, trombose e necrose (Basson et al. 1970).

O quadro clínico caracteriza-se por prostração, inapetência, anorexia, taquicardia, taquipneia, hipomotilidade ruminal e hipertermia ($> 41^{\circ}\text{C}$), que pode estar associada com a diminuição acentuada da produção de leite e abortos (Pols 1960; Kumi-Diaka et al. 1981; Ryan et al 2016). A diarreia é um sinal clínico raro (Pols 1960).

A dispneia inspiratória é um achado clínico comum, resultante da inflamação das mucosas das vias aéreas superiores (McCully et al. 1966).

A pele do plano nasal, região periorbital, escroto e pescoço apresenta hiperémia, congestão e petéquias, sendo mais perceptíveis em animais de pele clara (Basson et al. 1970; Gollnick et al. 2015). A conjuntiva encontra-se hiperêmica e, por vezes, surge corrimento nasal e ocular seroso ou seromucoso, fotofobia e epífora (Basson et al. 1970; Jacquiet et al. 2010).

3.6.1.2. Anasarca

Após o período febril, a temperatura corporal retorna a valores fisiológicos, mas, com a proliferação dos taquizoítos nas células do hospedeiro, as lesões degenerativas das células endoteliais dos vasos agravam-se, levando ao aumento da permeabilidade vascular, responsável pela presença de edemas subcutâneos (Ferreira 1985). Os edemas são característicos da denominada fase de anasarca, a qual tem a duração de uma a duas semanas. Os animais podem apresentar edema subcutâneo generalizado (anasarca) ou localizado na cabeça e pescoço, progredindo para os membros e regiões anatômicas ventrais, tais como o úbere, prepúcio e escroto (Pols 1960; Basson et al. 1970). Alguns quistos de pequenas dimensões podem estar presentes nos tecidos em simultâneo com os edemas, 11 dias até 4-5 semanas após a infecção (Basson et al. 1970; Gollnick et al. 2015).

Os sinais clínicos variam de acordo com a localização e gravidade dos edemas subcutâneos. A pele das regiões afetadas fica quente e dolorosa à palpação (Pols 1960).

Nas fêmeas é observada congestão do úbere e hiperpigmentação dos tetos. Nos machos é possível observar orquite aguda, com hipertrofia e edema do escroto, e testículos inchados e sensíveis à palpação. A infertilidade transitória ou definitiva dos machos é uma sequela destas lesões (Kumi-Diaka et al. 1981; Cortes et al. 2005). As lesões degenerativas e necróticas nos testículos são causadas pela hipertermia, que origina uma hiperglicemia, prejudicial para células testiculares; por alterações circulatórias, de irrigação e permeabilidade vascular, devido à multiplicação dos taquizoítos nas células endoteliais dos vasos; e pela

multiplicação das formas proliferativas de *B. besnoiti* nas células de Sertoli. Estas alterações causam repercussões na estabilidade do epitélio seminífero, na barreira hematotesticular e na síntese e mediação de hormonas (Ferreira 1985).

Os animais apresentam relutância ao movimento e preferem o decúbito devido ao inchaço dos membros e presença de arterites serofibrinosas (Basson et al. 1970). Posteriormente, surgem áreas de degeneração e necrose muscular (Gollnick et al. 2015).

Em casos graves, ocorre edema alveolar e intersticial nos pulmões, com consequentes sinais de dispneia, levando à morte do animal em raras ocasiões (Álvarez-García et al. 2013).

Os animais podem ainda desenvolver um quadro clínico fatal com nefrite intersticial, proteinúria, hipoalbuminemia acentuada e ligeira leucocitose (Dubey et al. 2013).

Para além da presença de edemas, verifica-se também hipertrofia dos linfonodos com infiltração plasmocitária, edema e focos hemorrágicos (Dubey et al. 2013; Hornok et al. 2015). Outros achados patológicos incluem petéquias, hemorragias e focos de necrose no pulmão, traqueia, laringe, coração, rim, glândulas adrenais, abomaso e mucosa uterina (Basson et al. 1970), e também esplenomegalia, hepatite, estase biliar, peritonite e pleurite fibrinosa (Basson et al. 1970; Frey et al. 2013).

3.6.2. Fase crónica

A fase crónica da doença surge, geralmente, três a quatro semanas após o início da hipertermia. É marcada pela presença de sinais cutâneos característicos e de quistos nos tecidos (Bigalke 1968; Álvarez-García et al. 2013).

O quadro clínico caracteriza-se por esclerodermia, espessamento, pregueamento, perda de elasticidade e liquenificação da pele. Nas áreas com maior carga parasitária, verifica-se queda de pelo, alopecia, seborreia e fissuras na pele, com exsudado serosanguinolento. Por vezes, nas áreas com lesões, surgem infeções secundárias por bactérias, miíases (Calliphoridae e Sarcophagidae) (Basson et al. 1970) e ácaros (*Demodex bovis*) (Villa et al. 2020). Os ductos das glândulas sudoríparas geralmente estão dilatados, o que coloca a possibilidade dos bradizoítos atingirem o exterior através da transpiração (Hornok et al. 2015).

As lesões cutâneas surgem principalmente na pele do pescoço, plano nasal, região periorbital, membros posteriores, base da cauda, glândula mamária e escroto (Basson et al. 1970). Estas lesões são persistentes, apesar de se verificar uma melhoria clínica em alguns animais (Pols 1960). Nas infeções residuais, o parasita pode persistir no trato respiratório superior (rinário, laringe, faringe), pele e trato reprodutivo (Frey et al. 2013).

Outros sinais clínicos incluem linfadenomegália superficial, corrimento nasal purulento e crostas em torno das narinas, acompanhados por dispneia inspiratória (estridor). Alguns animais apresentam uma ligeira reação febril durante algumas semanas, com diminuição do apetite e deterioração gradual da condição corporal (Ferreira 1985).

Os quistos formam-se a partir da invasão dos parasitas em células do hospedeiro. Os taquizoítos transformam-se em bradizoítos, derivado de um mecanismo de evasão da resposta imune (Basson et al. 1970; Cortes et al. 2014; Gollnick et al. 2015). As células hospedeiras encontram-se hipertrofiadas e com múltiplos núcleos achatados à periferia. A parede dos quistos de *Besnoitia spp.* é composta por duas camadas: uma externa, composta por colagénio; e uma camada interna, composta por proteoglicanos e extensões filamentosas que se projetam na membrana externa (Dubey et al. 2013; Langenmayer et al. 2015).

As dimensões dos quistos maduros variam entre 300 e 600 µm de diâmetro e estão relacionadas com o tempo de infeção decorrido (Basson et al. 1970; Basso et al. 2011). Os quistos presentes na esclera e mucosa vestibulo-vaginal são patognómicos e desenvolvem-se 6 a 7 semanas após a infeção (Bigalke 1968). Nos outros tecidos, os quistos maduros surgem aproximadamente 71 dias após a infeção (Basson et al. 1970).

Em torno dos quistos pode estar presente uma reação inflamatória, geralmente de natureza granulomatosa e fibrótica, juntamente com hiperqueratose e acantose. Este fenómeno parece ter relação com a desintegração e rotura de quistos teciduais, observada 30 dias após a infeção (Basson et al. 1970; Frey et al. 2013), o que pode explicar a parasitemia esporádica na fase crónica (Gutiérrez-Expósito et al. 2017b). Contudo, a gravidade e tipo de inflamação é variável entre regiões anatómicas e pode refletir diferentes fases de desenvolvimento do parasita ou microambientes dos tecidos (Ryan et al. 2016). Os infiltrados celulares incluem macrófagos, linfócitos T, alguns linfócitos B, eosinófilos e células gigantes multinucleadas (Frey et al. 2013). A presença de resposta inflamatória em torno dos quistos parece ser o fator determinante para a apresentação de sinais clínicos em algumas localizações. Por exemplo, a inflamação presente na língua condiciona a preensão de alimentos e leva a anorexia, ao contrário da presença de quistos com reação inflamatória reduzida ou ausente (Ryan et al. 2016).

Os quistos desenvolvem-se preferencialmente nas veias e artérias da derme (principalmente no estrato papilar), tecido conjuntivo intermuscular, conjuntiva ocular, esclera, testículo, epidídimo, vestibulo e vagina, e ainda nas aponevroses, mucosa nasal, cartilagens laríngeas, traqueia e mucosa do canal do teto (Bigalke 1968; Ferreira 1985; Frey et al. 2013; Álvarez-García et al. 2013; Ryan et al. 2016). Podem estar presentes noutros locais, como músculos esqueléticos e tendões dos membros, perióstio dos ossos do metatarso e metacarpo, córion laminar e, por vezes, no tecido conjuntivo e músculos da língua, linfonodos, baço, fígado, pulmão, coração e mucosa uterina (Basson et al. 1970; Kumi-Diaka et al. 1981; Olias et al. 2011; Frey et al. 2013; Villa et al. 2019).

Quando os quistos se projetam para o lúmen dos vasos sanguíneos, em conjunto com lesões de vasculite e trombose, diminuem o fluxo sanguíneo e a irrigação dos tecidos. As perturbações circulatórias dos vasos da derme causam perda de pelo, alopecia e necrose da

pele. No plexo pampiniforme, as lesões vasculares são responsáveis pela degenerescência e fibrose testicular (Kumi-Diaka et al. 1981; Ferreira 1985). Além do plexo pampiniforme, também é possível detetar quistos no parênquima testicular, epidídimo e túnica dartos, vaginal e albugínea, com algum exsudato peritoneal (Basson et al. 1970; Kumi-Diaka et al. 1981). Os quistos localizados nos túbulos seminíferos comprimem diretamente o tecido e produzem lesões degenerativas, calcificação distrófica e focos de necrose. No exame clínico, os testículos apresentam-se atrofiados, duros e parecem fibróticos (Kumi-Diaka et al. 1981).

A esclerodermia presente nas várias regiões anatómicas está associada com o espessamento da pele (Basson et al. 1970; Gollnick et al. 2015). O espessamento da pele do escroto está relacionado com uma deficiente termorregulação, que pode contribuir para azoospermia e infertilidade permanente (Ferreira 1985).

De facto, os testículos são órgãos-alvo para a replicação e persistência de *B. besnoiti*. As lesões derivadas tanto da fase aguda como da fase crónica têm graves consequências na fertilidade dos machos e nos parâmetros reprodutivos da manada (Esteban-Gil et al. 2016). Não se verificam quistos ou outras formas parasitárias no ejaculado, mas podem estar presentes muitas células gigantes e epiteliais, principalmente em touros clinicamente infetados (Kumi-Diaka et al. 1981). No entanto, a infertilidade parece ser uma consequência tardia, uma vez que as características do ejaculado de touros assintomáticos podem encontrar-se dentro dos parâmetros normais. Neste caso, os animais mantêm a capacidade de fertilização, mas são uma fonte de infeção (Cortes et al. 2006a).

A laminite crónica está descrita em animais gravemente afetados. A presença de quistos no córion laminar e vasos da derme dos cascos origina alterações no fluxo sanguíneo, com formação de trombos. A deficiente perfusão resulta de lesões isquémicas no tecido lamelar e de osteomielite na falange distal. Com a distribuição não uniforme do peso corporal, pode ocorrer rotação da falange distal (Gollnick et al. 2015).

3.6.3. Diagnósticos diferenciais

Dado a inespecificidade dos sinais clínicos na fase aguda da doença, a lista de diagnósticos diferenciais é extensa. Nesta lista estão incluídas a Rinotraqueite Infeciosa Bovina (IBR), Língua-Azul, Febre Catarral Maligna, Pasteurelose, infeção por *Mycoplasma bovis*, piroplasmoses (Anaplasmoses e Babesiose), (Jacquiet et al. 2010; Cortes et al. 2014; Ryan et al. 2016) e insuficiência cardíaca (Waap 2015).

As lesões cutâneas da fase crónica podem ser confundidas com sarna sarcótica, pediculose, dermatofitose, dermatofilose, fotossensibilidade, deficiência de oligoelementos (exemplo: zinco), intoxicação por mercúrio e ervilhaca (*Vicia villosa*), reações alérgicas, linfoma cutâneo e dermatite nodular (*Lumpy skin disease*) (Jacquiet et al. 2010; Álvarez-García et al. 2013, Waap 2015; Ryan et al. 2016).

3.7. Resposta imunitária

Os bovinos contraem a doença uma única vez, tornando-se resistentes quando não sucumbem à mesma. Os animais curados ficam portadores e desenvolvem uma resposta imunitária durante oito anos, enquanto os quistos mantiverem a sua viabilidade (Ferreira 1985).

A resposta imunitária parece ser essencialmente mediada por células e é fundamental no controlo da infeção. A presença de linfócitos T em torno dos quistos e a ação de citocinas (exemplo: IFN- γ) promovem a quimiotaxia e ativação de macrófagos, que conduz a reações de hipersensibilidade retardada, cuja evidência morfológica é observada nos granulomas produzidos pelos quistos (Ferreira 1985; Álvarez-García et al. 2014b).

A imunidade humoral também tem um papel na patogenia da doença. Após a infeção, os animais desenvolvem uma resposta inata de IFN- γ , seguida por uma resposta adaptativa de IFN- γ evidenciada por seroconversão (Diezma-Díaz et al. 2019). Nas infeções naturais os anticorpos específicos contra *B. besnoiti* são detetáveis 15-18 dias após a infeção e persistem por longos períodos (~210 dias) (Álvarez-García et al. 2013; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

A resposta imunitária e a seroconversão variam com a forma parasitária e via de inoculação, as quais condicionam o quadro clínico desenvolvido. Os bradizoítos inoculados por via intradérmica parecem ser determinantes para a infeção crónica, o que permite a evasão ao sistema imune e a persistência do parasita no hospedeiro durante um período prolongado (Diezma-Díaz et al. 2019).

A maioria dos animais infetados é assintomática mas seropositiva, podendo apresentar DNA de *B. besnoiti* na pele (Frey et al. 2013; Gollnick et al. 2015). No entanto, quando a distribuição intraorgânica do parasita é baixa, espera-se que uma resposta imune celular eficiente tenha eliminado a maioria dos parasitas (Diezma-Díaz et al. 2018). Os animais com quistos na esclera ou lesões perceptíveis apresentam títulos de anticorpos mais elevados, envolvendo uma estimulação ativa e permanente do sistema imunitário (Liénard et al. 2011). A rutura de quistos teciduais pode favorecer a reexposição de antígenos do parasita ao sistema imunitário, verificando-se um aumento dos títulos de anticorpos específicos (Frey et al. 2013). Existe ainda uma pequena percentagem de animais seronegativos (1-3%) com sinais de esclerodermia (Schaes et al. 2010; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a; Villa et al. 2019). Isto poderá ocorrer devido a falhas nos testes serológicos, à tolerância imunológica ao parasita ou a uma recuperação serológica desses animais (Esteban-Gil et al. 2017).

Os animais em estado de imunossupressão (exemplos: periparto, administração de corticosteroides) apresentam maior suscetibilidade à infeção por *B. besnoiti* e sinais clínicos de maior gravidade (Bigalke 1968). Para além disso, a presença de outras doenças concomitantes (exemplo: Demodecose bovina) sustenta a associação entre a besnoitiose bovina e imunossupressão (Villa et al. 2020).

3.8. Impacto económico

O impacto económico da besnoitiose bovina na Europa permanece indeterminado, mas as consequências são graves em regiões endémicas (EFSA 2010).

Embora considerada uma doença parasitária negligenciada, com taxas de mortalidade relativamente baixas, a maioria dos médicos-veterinários familiarizados com a doença atribui-lhe uma importância económica média a alta com consequências no bem-estar animal (Cortes et al. 2003; Olias et al. 2011; Waap et al. 2015; Vila et al. 2019).

Devido ao carácter crónico e debilitante da doença, os animais podem perder a totalidade do seu valor comercial num intervalo de três anos, levando ao seu refugo precoce (Bigalke 1968; Cortes et al. 2014). As perdas económicas estão relacionadas com a diminuição da condição corporal dos animais, que pode deteriorar-se em cerca de 6 semanas (Cortes et al. 2005; Jacquet et al. 2010); da diminuição da produção de leite, que se reflete nas taxas de crescimento dos vitelos criados em regime extensivo (Cortes et al. 2014); dos abortos, que ocorrem ocasionalmente durante a fase febril da doença; da infertilidade transitória ou permanente dos machos, derivada da atrofia, esclerose e necrose dos testículos (Bigalke 1968; KumiDiaka et al. 1981).

No matadouro, a presença de quistos na derme contribui para a depreciação da pele para produção de couro (Pols 1960; Jacquet et al. 2010; Álvarez-García et al. 2013). A redução da qualidade e rendimento das carcaças é derivada do quadro clínico, tanto agudo como crónico, observado no animal em vida, que dá origem a lesões irreversíveis. O elevado grau de emaciação e a presença de quistos nos músculos, tecido conjuntivo intermuscular, fáscias (Figura 5) e alguns órgãos podem levar à rejeição parcial ou mesmo total de carcaças (Pols 1960; Frey et al. 2013; Villa et al. 2019).

No sector leiteiro, o impacto na produção de leite ainda é desconhecido, apesar de haver evidências da diminuição de alguns parâmetros produtivos, tais como a produção de leite diária, teor butiroso e teor de proteína em animais com sinais de cronicidade da doença (quistos). Mesmo na ausência de evidências estatísticas, a diminuição da produtividade pode estar relacionada com a debilidade causada pela doença (Villa et al. 2019).

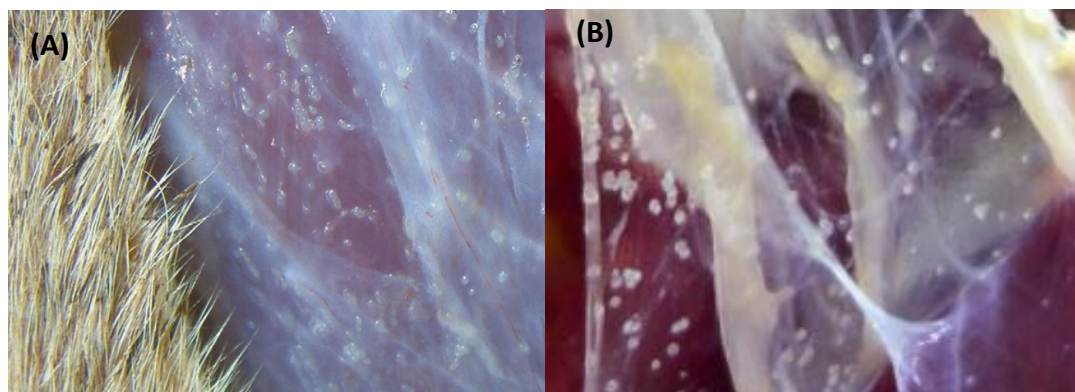


Figura 5 – Quistos no músculo e fáscias (adaptado de Gentile et al. 2012 e Langenmayer et al. 2015)

3.9. Diagnóstico

As técnicas de diagnóstico disponíveis podem ser diretas ou indiretas (Cortes et al. 2014). Os métodos de diagnóstico diretos são baseados na detecção do parasita ou do seu DNA nos tecidos ou sangue através de biopsias e esfregaços sanguíneos, histopatologia e imunohistoquímica, citologia da conjuntiva, esclera ou mucosa vaginal, PCR, RT-PCR ou pela identificação de lesões macroscópicas no exame clínico. Os métodos de diagnóstico indiretos consistem na detecção de anticorpos específicos, dos quais se destacam o ELISA, Western blot, IFAT e B-MAT (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

Não são conhecidos biomarcadores específicos para detecção de besnoitiose bovina, no entanto, em animais gravemente afetados, estão descritas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Os achados laboratoriais consistem em leucopenia, anemia, concentrações reduzidas de albumina, ureia, magnésio e cálcio, que estão associados à inapetência e anorexia verificadas na fase aguda da doença (Langenmayer et al. 2015; Diezma-Díaz 2019). A presença de hipergamaglobulinénia pode estar associada à produção de anticorpos específicos contra *B. besnoiti*. Verifica-se também um aumento das concentrações séricas de bilirrubina total, creatinina, glutamato desidrogenase (GLDH), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina quinase (CK). Esses achados são atribuídos à inflamação e necrose muscular (Langenmayer et al. 2015; Ryan et al. 2016). Os valores de BHB parecem estar aumentados em animais seropositivos e/ou com quistos nos tecidos, o que pode sugerir um aumento do balanço energético negativo (BEN) associado ao consumo de energia por células hospedeiras infetadas (Alshehabat et al. 2016).

A abordagem diagnóstica depende do cenário epidemiológico da exploração e da área geográfica em que se insere, bem como do quadro clínico (Cortes et al. 2014), visto que ainda não existe um método de diagnóstico *gold standard* (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

Os casos clínicos que se desenvolvem na fase crônica são fáceis de diagnosticar no exame clínico. No entanto, a maioria dos animais infetados apresenta infecção subclínica, ou seja, ausência de quistos nos tecidos (Bigalke 1968). Para além disso, a fase aguda da doença pode passar despercebida ou ser confundida com outras doenças (Jacquiet et al. 2010). Assim, o diagnóstico de besnoitiose bovina é baseado na combinação do exame clínico e de testes serológicos (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

A prevalência deve ser avaliada por serologia, para evitar a entrada da infecção em efetivos indemnes ou para controlar a doença em explorações infetadas (Cortes et al. 2006b). Contudo, alguns animais podem apresentar títulos de anticorpos abaixo do limiar de detecção dos testes serológicos (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). A serologia pode ser complementada por outros testes, como por exemplo PCR ou biopsias, em animais de elevado valor ou suspeitos de se encontrarem na fase aguda da doença, aumentando a sensibilidade do diagnóstico (Schaes et al. 2011). No entanto, os métodos de diagnóstico diretos não devem substituir a serologia (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

3.9.1. Métodos diretos

3.9.1.1. Exame clínico

Na fase crónica, os sinais clínicos observados com maior frequência no campo são o espessamento das pregas da pele, alopecia, hiperqueratose e fissuras entre as pregas de pele. Nenhum destes sinais é patognómico, mas o seu conjunto é fortemente sugestivo de besnoitiose bovina, principalmente em áreas endémicas (Waap et al. 2015).

A presença de quistos na esclera e na mucosa vestibulo-vaginal são patognómicos. Estes quistos estão presentes apenas em cerca de 50% dos animais infetados. A investigação de quistos, especialmente na esclera, exige condições de luminosidade adequadas, sendo aconselhado fazê-la ao ar livre (Bigalke 1968). A experiência do médico-veterinário pode condicionar a sua correta deteção (Bigalke 1968; Waap et al. 2015).

A falta de sensibilidade dessa abordagem diagnóstica macroscópica foi referida por Bigalke (1968). Em casos suspeitos em que não é possível detetar lesões ou quistos patognómicos, o animal deve ser testado serologicamente (Liénard et al. 2011).

3.9.1.2. Biópsia e esfregaço sanguíneo

Numa fase inicial, a besnoitiose bovina pode ser diagnosticadas através de esfregaços de sangue ou de linfonodos. Ocasionalmente, alguns taquizoítos estão presentes poucos dias após a seroconversão dentro das células endoteliais na camada papilar da derme. No entanto, os taquizoítos são difíceis de detetar (Pols 1960; Bigalke 1968; Langenmayer et al. 2015).

As biópsias são obtidas por punção, com 8 mm de diâmetro, em locais onde a pele exhibe as alterações patológicas. Estas amostras de pele podem ser submetidas a outros métodos de diagnóstico direto (Cortes et al. 2014).

Os parasitas presentes na amostra de tecido obtida podem ser visualizados por microscopia ótica ou por microscopia eletrónica de transmissão (TEM) (Cortes et al. 2006c).

Para confirmar casos clínicos suspeitos de animais cronicamente infetados no campo, é possível fazer um esfregaço a partir de uma biópsia cutânea ou de raspagens da conjuntiva (Sanussi et al. 1991 citado por Jaquiet et al. 2010) e mucosa vestibulo-vaginal (Rostaher et al. 2010 citado por Cortes et al. 2014), comprimidas entre vidros de triquinoscópio, para deteção de quistos e bradizoítos (Figura 6A). Este método é rápido e económico.

A sensibilidade desses métodos é baixa em bovinos infetados subclínicamente e o parasita pode não ser detetado em animais infetados cronicamente, pois os quistos não estão uniformemente distribuídos nos tecidos (Dubey et al. 2013; Schares et al. 2016). A região da garupa, base da cauda e a parte distal dos membros posteriores parecem ser as localizações mais indicadas e com maior sensibilidade para fazer biópsias de pele e posterior deteção ou isolamento de *B. besnoiti* (Schares et al. 2016; Grisez et al. 2020).

3.9.1.3. Histopatologia e imunohistoquímica

Os quistos teciduais podem ser detetados por histopatologia, através de cortes histológicos corados com hematoxilina eosina, e por imunohistoquímica, utilizando anticorpos policlonais anti-*Besnoitia spp.* específicos contra bradizoítos ou taquizoítos (Frey et al. 2013). As amostras são obtidas por biópsias de pele de bovinos (Cortes et al. 2014).

A observação microscópica de cortes histológicos permite identificar quistos com características morfológicas específicas, principalmente a estrutura da sua parede (Figura 7A). O resultado deste método só é conclusivo quando o número de quistos é elevado (Dubey et al. 2003; Cortes et al. 2007a)

A imunohistoquímica oferece maior sensibilidade do que a histopatologia, biópsias e esfregaços sanguíneos, dado que consegue detetar taquizoítos na circulação sanguínea na fase aguda e infiltrados inflamatórios na fase de esclerodermia (Frey et al. 2013).

Ambas as técnicas de diagnóstico possuem baixa sensibilidade, particularmente em animais com infecção subclínica (Cortes et al. 2003). Para além disso, requerem experiência laboratorial e são mais dispendiosas e demorosas do que outros métodos laboratoriais. A sua utilidade está limitada a estudos de investigação relacionados com lesões e distribuição do parasita (Frey et al. 2013; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

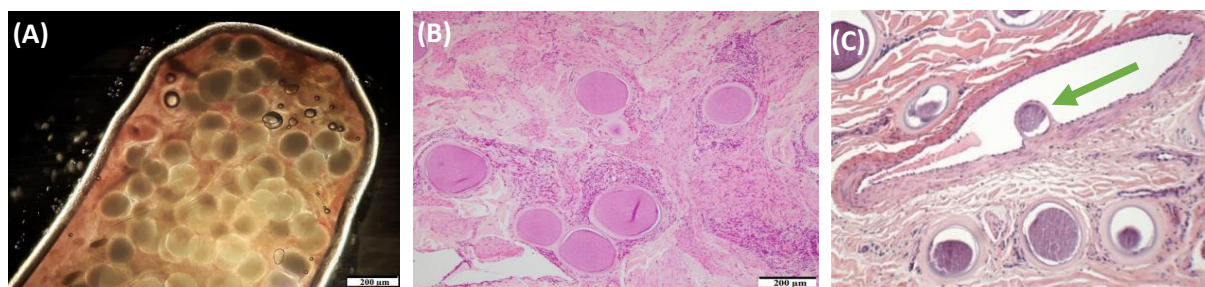


Figura 6 – Quistos após a compressão entre vidros (A); Quistos teciduais na pele (B) e proeminentes no lúmen dos vasos (seta) (C) (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a e Ryan et al. 2017)

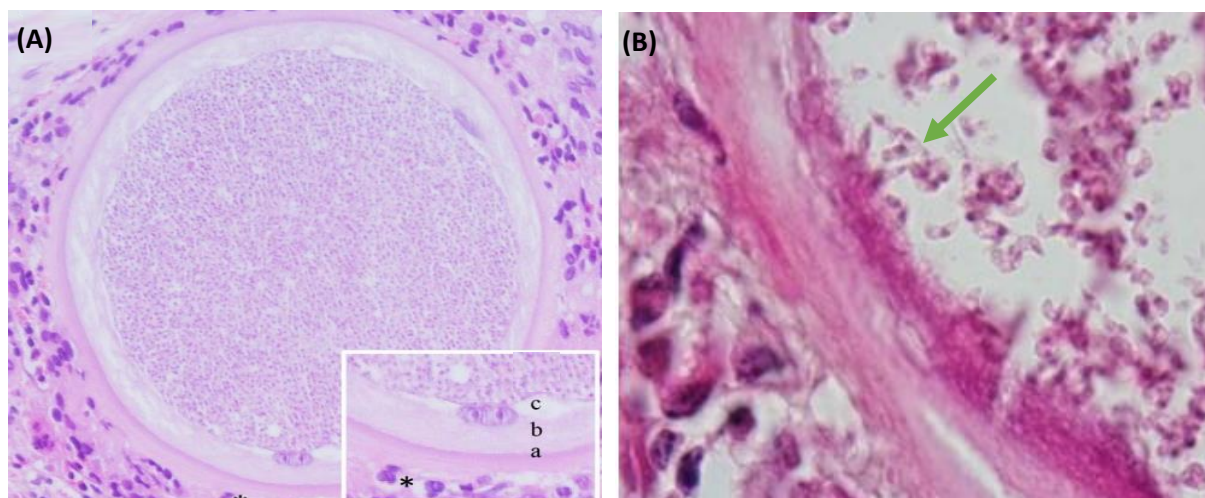


Figura 7 – Estrutura da parede de um quisto (A) (a: camada externa; b: camada interna; c: núcleo da célula hospedeira achatado) com bradizoítos (seta) (B) (adaptado de Diezma-Díaz 2019 e Cortes et. al 2004)

3.9.1.4. PCR

As técnicas de diagnóstico molecular (PCR e RT-qPCR) podem ser testadas em amostras de sangue, tecido cutâneo e membranas mucosas (trato respiratório superior, vestíbulo e vagina), obtidas em biopsias. São baseadas na amplificação das sequências ITS-1 do DNA do parasita e apresentam sensibilidade e especificidade elevadas. (Cortes et al. 2007a; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). A PCR trata-se de um método qualitativo (Cortes et al. 2007a). Existem *kits* comerciais de PCR disponíveis, cuja sensibilidade e especificidade é desconhecida. A RT-qPCR é uma técnica quantitativa, que permite a detecção do parasita 1 a 3 dias depois do início da fase febril, numa amostra reduzida (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

Estas técnicas são mais indicadas do que os testes serológicos para detecção de casos agudos, conseguindo, ocasionalmente, detetar parasitemia ou DNA do parasita nos tecidos antes da seroconversão. Nestes casos, são utilizados como ferramenta de diagnóstico complementar para confirmação de resultados duvidosos (Schaes et al. 2013; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). A utilidade destas técnicas laboratoriais estende-se ainda ao diagnóstico pós-morte em animais que sucumbem à doença, sendo possível obter amostras, por exemplo, de testículo em touros reprodutores (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

Apesar disso, a PCR e a RT-qPCR não são utilizados por rotina para diagnóstico. São particularmente úteis em estudos relacionados com a distribuição intraorgânica do parasita (Frey et al. 2013), em estudos clínicos, farmacológicos (Cortes et al. 2007b, 2011) e epidemiológicos, para detecção do parasita noutros hospedeiros (Basso et al. 2011) e artrópodes (Liénard et al. 2011; Gollnick et al. 2015).

As limitações dos métodos de diagnóstico molecular estão relacionadas com a distribuição da carga parasitária no organismo e duração da infeção. Os animais infetados há mais tempo apresentam cargas parasitárias mais baixas, possivelmente devido à resposta imunológica celular e humoral contra o parasita (Frey et al. 2013). No entanto, existe um relato de parasitemia num bovino cronicamente infetado (Gutiérrez-Expósito et al. 2017b).

Os níveis elevados de DNA nos tecidos são detetados na fase crónica da doença devido ao aumento do diâmetro dos quistos (Schaes et al. 2013; Langenmayer et al. 2015). A carga parasitária é mais elevada nas áreas anatómicas posteriores dos animais, orelhas e nariz, e mais baixa na cabeça, pescoço e zona ventral (Schaes et al. 2016). A base da cauda parece ser o local mais sensível para determinar a quantidade de DNA de *B. besnoiti* por RT-qPCR (Grisez et al. 2020).

3.9.2. Métodos indiretos

Os ensaios serológicos utilizam antígenos de taquizóitos ou bradizoítos (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Os antígenos são produzidos em culturas *in vitro* a partir de isolados de bovinos infetados (Cortes et al. 2006c, 2014; Schaes et al. 2009).

3.9.2.1. ELISA

O ELISA é um método laboratorial utilizado numa primeira abordagem diagnóstica. Permite um diagnóstico rápido e avaliar a seroprevalência numa exploração ou área geográfica, principalmente em estudos epidemiológicos (Shkap et al. 1984). A sensibilidade e especificidade do ensaio já foi observada como de 87% e 96% (Cortes et al. 2006b).

Estão disponíveis no mercado vários *kits* comerciais de ELISA que podem ser usados em grande escala ou em animais individuais (Cortes et al. 2014). O ELISA convencional deteta essencialmente IgG (Cortes et al. 2006b).

Novas técnicas de ELISA foram desenvolvidas, nomeadamente um ELISA que utiliza antigénio purificado por afinidade (Apure-BbELISA) (Schaes et al. 2013), um ELISA que deteta IgM (7-19 dias após a infeção) (Diezma-Díaz et al. 2020) e um ELISA de competição (Bb-cELISA) (Schaes et al. 2020), que permitem diagnosticar e diferenciar besnoitiose aguda e crónica. Estes ensaios têm maior sensibilidade e especificidade que o ELISA convencional (Cortes et al. 2006b; Schaes et al. 2013; Diezma-Díaz et al. 2020; Schaes et al. 2020).

No entanto, em casos individuais, animais de grande valor (exemplo: touros reprodutores) ou resultados duvidosos (exemplos: reações cruzadas, títulos de anticorpos baixos) é preferível complementar o resultado com outros métodos de maior sensibilidade e especificidade, como o Western blot ou IFAT (Cortes et al. 2006b). Em resultados duvidosos, foi sugerido um sistema de referência que inclui um IFAT e dois Western blots, cuja confirmação da infeção exige a positividade de dois destes três testes (Schaes et al. 2013; Gollnick et al. 2015; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a)

3.9.2.2. Western Blot

Foram desenvolvidos diferentes tipos de Western blot, com variações na fonte antigénica (taquizoítos ou bradizoítos), nos critérios de positividade e condições redutoras ou não redutoras (Cortes et al. 2006b; Fernández-García et al. 2009; Schaes et al. 2010). Este método consiste na extração total de proteínas do parasita, produzindo padrões antigénicos em bandas. No Western blot é possível identificar três áreas de reatividade antigénica, cujo resultado positivo depende da presença de um conjunto mínimo de bandas (Cortes et al. 2006b; Schaes et al. 2010).

O Western blot apresenta sensibilidade e especificidade próximas dos 100%, sendo utilizado para confirmação de casos duvidosos (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Em ensaios recorrendo a taquizoítos em condições redutoras, a sensibilidade e especificidade foram, respetivamente, 91% e 96,4-100% (Cortes et al. 2006b). Em testes cujos antigénios consistiam em taquizoítos ou bradizoítos em condições não redutoras, a sensibilidade demonstrou ser mais elevada (98,6-100%) (Schaes et al. 2010).

Este método de confirmação é demorado, dispendioso e requer uma interpretação complexa em laboratórios especializados (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a).

3.9.2.3. Imunofluorescência Indireta (IFAT)

A IFAT foi a primeira prova serológica a ser desenvolvida por Neuman (1972) (citado em Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Esta técnica tem como base a detecção de anticorpos específicos contra a superfície dos taquizoítos de *B. besnoiti*, cuja diluição de *cut-off* do soro varia entre 1:200 e 1:256. Em diluições mais baixas ($\leq 1:64$) podem ocorrer reações cruzadas com outras coccídias, nomeadamente *N. caninum* (Shkap et al. 2002). A sensibilidade e especificidade são de 89,6% e 99,7%, respetivamente (Waap et al. 2014).

No passado, era considerada o teste laboratorial *gold standard*. Atualmente, não é recomendada como diagnóstico de rotina, dadas as suas limitações relacionadas com custos elevados e com o requerimento laboratorial especializado em termos materiais e de experiência do observador na interpretação dos resultados (Cortes et al. 2014). A sua utilidade resume-se à confirmação de resultados duvidosos testados por outras técnicas serológicas, como o ELISA (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a)

3.9.2.4. Teste de aglutinação direta modificado (B-MAT)

O B-MAT baseia-se na aglutinação de taquizoítos fixados com formol na presença de anticorpos IgG específicos, presentes em amostras de soro diluídas. Nos bovinos, são utilizadas diluições com *cut-off* de 1:160 (Waap et al. 2011, 2014).

Este teste oferece várias vantagens, incluindo alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e aplicabilidade em larga escala. Isto é particularmente útil em áreas tropicais, onde, muitas vezes, os outros métodos laboratoriais são inacessíveis, dada a exigência de equipamentos sofisticados, reagentes caros e especialização técnica (Waap et al. 2011).

Para além disso, não necessita de anticorpos secundários anti-espécie, podendo ser adaptada em estudos epidemiológicos em várias espécies que possam estar envolvidas no ciclo biológico de *B. besnoiti* (Waap et al. 2011, 2016; Mazuz et al. 2018). No entanto, não é uma técnica de diagnóstico de rotina, uma vez que a sua interpretação é subjetiva (Waap et al. 2011).

Tabela 2 – Métodos de diagnóstico de besnoitiose bovina (adaptado de Diezma-Díaz 2019)

	Biopsia	Histopatologia	PCR	ELISA	Western blot	IFAT	B-MAT
Tempo de realização	Rápido	Vários dias	1 dia	1 dia	2-3 dias	1 dia	2 dias
Nº de amostras	Reduzido	Reduzido	Reduzido	Elevado	Reduzido	Reduzido	Reduzido
Tipo de amostra	Pele	Pele	Pele, sangue, testículos	Sangue	Sangue	Sangue	Sangue
Interpretação	Fácil	Fácil	Fácil	Objetiva	Objetiva (experiência)	Subjetiva (experiência)	Subjetiva
Requerimento laboratorial	Não	Sim (especializado)	Sim (especializado)	Sim	Sim (especializado)	Sim	Sim
Custo	Baixo	Elevado	Moderado	Baixo	Elevado	Elevado	Baixo
Sensibilidade	Baixo	Baixo	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Moderada
Especificidade	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Utilidade	Confirmação	Investigação	Confirmação Detecção de parasitemia Investigação	Diagnóstico Estudos epidemiológicos	Confirmação de casos duvidosos	Confirmação de casos duvidosos	Estudos epidemiológicos de animais silvestres

3.10. Tratamento

Atualmente, não existe nenhum composto químico licenciado para tratamento de besnoitiose bovina. Vários aspetos da biologia de *B. besnoiti* não são bem compreendidos, tornando o desenvolvimento de medicamentos direcionados contra essa doença longe de se tornar realidade (Eberhard et al. 2020). A forma crónica da doença torna o seu tratamento ainda mais desafiante, pois os quistos protegem os parasitas de reações imunológicas e fisiológicas por parte do hospedeiro, e representam uma barreira que diminui a capacidade de penetração dos princípios ativos (Cortes et al. 2011; Álvarez-García et al. 2014b).

No passado, algumas opções de tratamento para forma crónica da doença consistiam na administração de três injeções de 30 ml de uma solução de formalina, a cada 3 dias, ou cinco injeções intravenosas de 20-40 ml de iodo de Lugol com 4-7 dias de intervalo. Para a forma aguda recomendava-se uma dose única de 30ml de formalina a 1%. Não foram feitas avaliações destes tratamentos, tendo sido abandonados pelos efeitos adversos (Pols 1960).

Na prática clínica, o uso de sulfamidas (sulfadimerazina 200 mg/kg ou sulfadimetoxina 80 mg/kg) durante pelo menos sete dias foi sugerido para diminuir a gravidade dos sinais clínicos na fase aguda, dado que esta classe de antibióticos tem alguma ação coccidiostática. Porém o tratamento não era curativo e não tinha efeito na fase crónica (Jacquiet et al. 2010).

Sucederam-se ensaios em modelos *in vivo*, com coelhos e gerbilos, de princípios ativos como oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, halofuginona e aceturato de diminazeno. Verificou-se que, destes, apenas a oxitetraciclina, quando administrada no momento da infeção, tinha algum efeito na progressão dos sinais clínicos, prevenindo a ocorrência de orquites em coelhos, bem como promovendo a recuperação de gerbilos infetados (Shkap et al. 1987).

Em estudos mais recentes, a eficácia de vários princípios ativos foi testada em ensaios *in vitro*, com resultados promissores, que interferem essencialmente na fase de proliferação dos taquizoítos, prevenindo a sua disseminação intraorgânica. Alguns destes compostos são a nitazoxanida (tiazolideos) (Cortes et al. 2007b), arilimidamidas (Cortes et al. 2011), inibidores de quinase (BKIs) (Jiménez-Meléndez et al. 2017), decoquinato, diclazuril (Jimenez-Melendez 2018), buparvaquona (Muller et al. 2019), antibióticos da classe das quinolonas (ELQs) (Eberhard et al. 2020) e a curcumina (Cervantes-Valencia et al. 2019).

A curcumina é um pigmento natural produzido a partir do açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*). Possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e, também, antiprotzoárias, com eficácia contra coccídias. Aparece ser uma boa alternativa aos antiparasitários sintéticos, face ao aumento das resistências parasitárias, para além de não ter intervalo de segurança (IS). As suas propriedades antioxidantes podem contribuir para uma melhor qualidade e conservação da carne. Assim, a inclusão de curcumina na alimentação dos bovinos pode representar uma nova estratégia para o tratamento da besnoitiose, sendo um recurso com baixos custos de produção, especialmente na África e Ásia (Cervantes-Valencia et al. 2019).

Embora estes compostos pareçam promissores no tratamento de besnoitiose na fase aguda, são necessários mais estudos farmacocinéticos, com a finalidade de avaliar diferentes dosagens e formulações para obter uma maior biodisponibilidade, e testar num modelo de infecção experimental *in vivo*, para avaliar sua segurança e eficácia (Eberhard et al. 2020).

Assim, o tratamento dos animais afetados deve incidir numa terapêutica de suporte, através do controlo de miíases, da administração de antibióticos de largo espectro para combater as infeções secundárias, de anti-inflamatórios (corticoides ou AINES como o Meloxicam) para diminuir a inflamação perivascular e de diuréticos tiazínicos (hidroclorotiazida) ou de ansa (furosemida) para redução de edemas (Gollnick et al. 2015). A aplicação de cremes antimicrobianos e emolientes nas feridas pode ter alguma utilidade (Stilwell 2013). (Bigalke 1981). O fornecimento de um alimento de qualidade e de água *ad libitum*, bem como o isolamento dos animais infetados em instalações com condições higiénicas e ventilação adequadas, protegidas de radiações ultravioleta fortes e com camas confortáveis, são essenciais para a recuperação e bem-estar dos animais. Caso se opte pela terapêutica de suporte, é preciso ter em consideração que os animais tratados, mesmo que aparentemente curados, são portadores e constituem uma fonte de infecção para outros animais suscetíveis (Jacquiet et al. 2010; Álvarez-García et al. 2013).

3.11. Prevenção e controlo

A profilaxia médica da besnoitiose bovina não é totalmente eficaz. Existem vacinas vivas atenuadas disponíveis na África do Sul e em Israel, que não estão disponíveis no mercado europeu (Cortes et al. 2014). Foram desenvolvidas à base de taquizoítos produzidos a partir de culturas celulares. A vacina utilizada na África do Sul foi preparada com um isolado de gnu e é administrada numa dose única, sendo eficaz na prevenção da doença clínica num período de quatro anos, porém não previne infeções subclínicas (Bigalke et al. 1974). A revacinação a cada 2-3 anos é recomendada (Bigalke 1981). Em Israel, a vacina é preparada a partir de um isolado de um bovino naturalmente infetado. É administrada com frequência em animais importados neste país, principalmente touros reprodutores, por via subcutânea. No entanto, não existem estudos que comprovem a sua eficácia ou segurança (Cortes et al. 2014). Para além da utilização de ambas as vacinas estar geograficamente limitada, são dispendiosas, termolábeis, com prazo de validade curto e possuem risco de introdução artificial do agente em explorações indemnes (Cortes et al. 2014).

Assim, a prevenção e controlo da besnoitiose bovina passa pelo seu diagnóstico precoce e pelo estabelecimento do estado sorológico da manada, associado a medidas de biossegurança, para evitar a entrada do agente patogénico em explorações indemnes, e a medidas de biocontenção, para limitar a sua disseminação num efetivo infetado (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a; Diezma-Díaz 2019).

Antes da aquisição de novos animais é recomendada uma análise de risco, de acordo com o cenário epidemiológico de cada exploração, para evitar a introdução de animais portadores no efetivo (Diezma-Díaz et al. 2017). Em efetivos livres da doença, recomenda-se a realização de análises serológicas e um exame clínico de todos os animais adquiridos, incluindo os mais jovens (Diezma-Díaz et al. 2017), antes da sua entrada na exploração. Em explorações não infetadas de áreas endêmicas, os fatores de risco devem ainda ser minimizados. Se não for possível controlar estes fatores, idealmente, todos os animais devem ser examinados de forma sistemática no final do período de pastoreio e após o pico de atividade de insetos (Gollnick et al. 2015). Os casos suspeitos devem ser isolados e submetidos a uma avaliação clínica e serológica. Os animais positivos devem ser abatidos (Bigalke 1968).

Nas explorações infetadas, os principais objetivos são evitar a propagação da doença, através do controlo de fatores de risco e, posteriormente, reduzir gradualmente a sua prevalência através do refugo de animais com sinais clínicos, seropositivos ou com baixos índices produtivos. Para isto, é necessário manter uma relação custo-benefício entre o refugo dos animais e os seus índices produtivos (Álvarez-García et al. 2013). No caso de prevalências baixas, é recomendado eliminar todos os animais seropositivos. Já em efetivos com prevalências elevadas, o refugo seletivo parece ser a opção com maior viabilidade económica. Os animais gravemente afetados devem ser eliminados e substituídos por animais saudáveis seronegativos. Os animais serologicamente positivos devem ser separados dos negativos, evitando a proximidade dos diferentes lotes, sobretudo nos meses de primavera e verão (Álvarez-García et al. 2013). A separação física dos animais numa distância mínima de vinte metros pode minimizar o risco de transmissão do agente (Gollnick et al. 2015). No entanto, nem todas as explorações têm infraestruturas e condições para efetuar o isolamento dos animais seropositivos, especialmente explorações leiteiras, em que todas as vacas se reúnem na sala de ordenha. A contribuição de cada animal infetado para a disseminação do parasita depende da carga parasitária presente nos tecidos, que geralmente é maior nos animais com sinais clínicos (Bigalke et al. 1968). No entanto, a maioria dos animais são assintomáticos e alguns poderão apresentar elevadas cargas parasitárias nos tecidos, tendo uma grande contribuição na disseminação de *B. besnoiti*. A quantificação da carga parasitária, por RT-PCR, especialmente em biópsias cutâneas na base da cauda, permite identificar os animais que apresentam maior contribuição para a transmissão do parasita (Grisez et al. 2020).

Para limitar a propagação entre efetivos e intraexploração, os fatores de risco devem ser minimizados através de estratégias reprodutivas, controlo de vetores e gestão de parques ou pastagens. A partilha de utensílios (exemplo: agulhas) entre animais nas diversas intervenções sanitárias deve também ser evitada (Pols 1960; Álvarez-García et al. 2013).

A monta natural poderá ser substituída por outras estratégias reprodutivas como a inseminação artificial (Pols 1960). Caso não seja praticável, em explorações com prevalências elevadas, os touros seronegativos devem permanecer com as fêmeas saudáveis, assim como os machos seropositivos com efetivo infetado (Álvarez-García et al. 2013). A qualidade do sémen deve ser avaliada periodicamente através de exames andrológicos (Cortes et al. 2006a). É recomendado eliminar fêmeas com quistos na mucosa vestibulo-vaginal (Gollnick et al. 2015; Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Poderá ainda ser benéfico evitar a concentração dos partos no verão. Nesta estação do ano não só existem maiores carências alimentares, que agravam a imunossupressão verificada na fase final da gestação, como também coincide com o período de maior atividade de vetores (Álvarez-García et al. 2013; Esteban-Gil et al. 2017).

A proteção dos animais contra insetos hematófagos é feita através da aplicação regular de inseticidas e de armadilhas para insetos, embora não exista nenhum programa profilático totalmente eficaz (Jacquiet et al. 2010; Álvarez-García et al. 2013). A sua aplicação deve ser feita nas épocas de maior risco, ou seja, no verão, pois, para além de não existirem produtos de longa ação disponíveis, a sua aplicação não é prática no campo. Os piretróides são as substâncias mais utilizadas, em pulverizações e soluções *pour-on* (Liénard et al. 2011).

A identificação de parques e de pastagens com maior concentração de insetos e condições propícias à propagação da doença poderá ser um ponto-chave no controlo. Assim, é possível limitar o acesso dos animais a estes locais (Álvarez-García et al. 2013). A limpeza periódica de parques ou a rotação de pastagens são medidas que contribuem para a redução da acumulação de fezes, que atraem insetos. Na hipótese de potenciais HD terem acesso à exploração, a limpeza frequente das instalações pode resultar na redução do número de oocistos presentes no ambiente (Talaíha et al. 2015). A delimitação física de áreas (exemplos: vedações, estabulação) pode evitar o contacto com bovinos de explorações vizinhas ou com potenciais hospedeiros silváticos intervenientes no ciclo biológico (Seltmann et al. 2020).

A besnoitiose bovina é controlada com maior facilidade em regimes de produção intensivos, onde existe um registo de dados produtivos ou individuais mais detalhado, o que permite uma melhor monitorização da evolução da doença, separação por lotes e refúgio seletivo de animais (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Os fatores de risco estão também mais controlados, uma vez que existe limitação do acesso e partilha de pastagens, limitação física de áreas, melhor eficácia da utilização de inseticidas em espaços fechados e a prática frequente da inseminação artificial (Liénard et al. 2011; Álvarez-García et al. 2013).

Para uma implementação de um plano de prevenção e controlo eficaz, é fundamental transmitir informações sobre aspetos clínicos e biológicos da besnoitiose bovina a médicos-veterinários e produtores, assim como sensibilizar para a sua importância económica, principalmente nas regiões de emergência recente (Waap 2015; Esteban-Gil et al. 2017).

4. Objetivos do estudo

O presente estudo teve como principal objetivo determinar o impacto da besnoitiose bovina na performance produtiva de bovinos com aptidão leiteira. Os objetivos secundários consistiram na avaliação do padrão serológico e clínico da exploração e na determinação uma correlação entre os parâmetros relativos à produção leiteira e reprodução com os resultados serológicos obtidos por IFAT e sinais clínicos observados. Outras variáveis, nomeadamente a idade e exploração de origem dos animais, assim como a fase do ciclo produtivo também foram consideradas na análise estatística, analisando fatores de risco.

A exploração foi escolhida como alvo deste estudo, uma vez que, na mesma, foram detetados possivelmente os primeiros casos clínicos besnoitiose em bovinos leiteiros em Portugal. Para além disso, existe uma colónia de felinos na exploração, que poderão intervir no ciclo biológico de *B. besnoiti*.

5. Material e métodos

5.1. Descrição da exploração e da área geográfica

Na exploração envolvida no estudo existiam aproximadamente 400 bovinos da raça Holstein Frísia, com cerca de 230 animais em produção, ordenhanhos 2 vezes por dia. O regime de produção era intensivo e os animais encontravam-se estabulados por parques, conforme a sua idade e fase do ciclo produtivo. Alguns parques tinham acesso a uma pequena área de pastagem, mais especificamente os da recria e das vacas secas. Os estábulos tinham aspersores, ventoinhas, piso de cimento e camas de areia. A maternidade possuía camas de palha, limpas semanalmente.

Os vitelos machos eram vendidos com 1 a 3 semanas de idade, enquanto as fêmeas ficavam na exploração para a recria. As novilhas eram sujeitas a inseminação artificial a partir dos 12 meses de idade. Existia um touro reprodutor no efetivo para cobertura natural das novilhas que não fiquem gestantes até à segunda inseminação artificial.

O programa profilático da exploração incluía imunização contra clostridiose e vírus respiratórios (IBR, Diarreia Viral Bovina, Parainfluenza 3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino), a cada 6 meses, e desparasitação externa com deltametrina, mensalmente entre Março e Outubro. O controlo de pragas era feito com o recurso a ratoeiras convencionais.

Tratava-se de uma exploração que comprava animais ocasionalmente a explorações da região. Porém, existia historial de partilha de pastagens com bovinos de carne de outras explorações existentes na região, há aproximadamente 3 anos. A colónia de gatos presente na exploração era constituída por 40 animais, que tinha contacto próximo com os bovinos. Algumas espécies silváticas tinham acesso a esta área, nomeadamente raposas e javalis.

Na exploração encontravam-se presentes outros agentes patogénicos da família Sarcocytidae, nomeadamente *Neospora caninum*, cuja prevalência foi determinada numa análise serológica ao tanque de leite.

Estas informações obtidas foram obtidas por comunicação pessoal com o produtor.

A exploração localizava-se no Alentejo Central. Nesta área existem muitos efetivos de bovinos de carne em regime extensivo. O clima da região tem influência marcadamente mediterrânica, sendo caracterizado por uma estação seca bem acentuada no verão. A temperatura mínima média é de 17°C e a máxima de 33°C. A precipitação ronda os 500 mm entre os meses de outubro e março e os 170 mm no semestre mais seco, sendo bastante irregular. Esta área encontra-se localizada numa planície (Weather Spark).

5.2. Caracterização da amostra

Todos os animais incluídos na amostra eram do sexo feminino e da raça Holstein Frísia. Relativamente à origem dos animais, 79% nasceram na exploração do estudo enquanto 21% dos animais eram provenientes de outras explorações (A,B e C) (Gráfico 3).

Procedeu-se à colheita de amostras para serologia no efetivo com mais de um ano, na tentativa de abranger a totalidade destes animais. A amostra testada por serologia englobou um total de 262 animais (Gráficos 4 e 5).

5.3. Recolha de amostras para serologia

A colheita foi realizada em 4 momentos: Outubro (n=54), Novembro (n=144) e Dezembro de 2020 (n=12) e Fevereiro de 2021 (n=52). Esta tarefa coincidiu com visitas realizadas à exploração para fim de diagnóstico de gestação, em que os animais se encontravam devidamente contidos nos cornadís. O número de SNIRB foi registado antes da colheita de sangue de forma a não repetir nenhum animal na amostragem.

O sangue foi coletado na veia coccígea com tubos secos e agulhas de 18G. As amostras foram refrigeradas a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g durante 20 minutos, colocadas em tubos *Eppendorf* devidamente identificados e conservadas a -18°C, até ao ensaio serológico (prova de IFAT).

5.4. Recolha de dados produtivos e individuais

A recolha de dados foi efetuada através do programa informático Bovinfor®.

Os dados individuais incluíram a idade do animal, origem, data de entrada na exploração e a fase do ciclo produtivo no respetivo dia da colheita da amostra para serologia. As fases produtivas foram divididas em pós-parto (0-30 dias de lactação), pico de lactação (31-90 dias de lactação), lactação (91- 305 dias de lactação), final de lactação (mais de 305 dias de lactação) e secagem/secas. A categoria de novilha refere-se aos animais mais novos incluídos na amostra, isto é, bovinos com idade entre os 12 e 24 meses.

Os dados reprodutivos registados foram o intervalo entre partos (IEP), número de inseminações até à concepção e historial de aborto e de patologia reprodutiva (metrite e retenção placentária) entre Janeiro de 2020 e Fevereiro de 2021.

Relativamente aos dados do contraste leiteiro, foi considerada uma média de 3 meses dos parâmetros nas vacas em lactação (n=216), para evitar a influência de situações pontuais nos resultados. Nas novilhas (n=13) que se encontravam em lactação no mês seguinte à colheita de amostras, foram considerados os dados registados nesse mesmo mês. Nas vacas secas (n=10) foram utilizados os dados de 1 ou 2 meses anteriores à data da secagem.

Os parâmetros analisados do contraste leiteiro foram a produção diária, teor de proteína, teor de gordura, ureia, contagem de células somáticas e a produção estimada aos 305 dias de lactação. A produção estimada aos 305 dias de lactação foi considerada, pois ajusta todas as vacas com a mesma idade, época de parto e duração da lactação. A variação (diferença entre valor máximo e mínimo) da produção diária entre os meses de Julho de 2020 e Março de 2021 também foi calculada e registada, tendo em consideração o número de lactação e a fase do ciclo produtivo.

Gráfico 3 – Distribuição dos animais conforme a origem

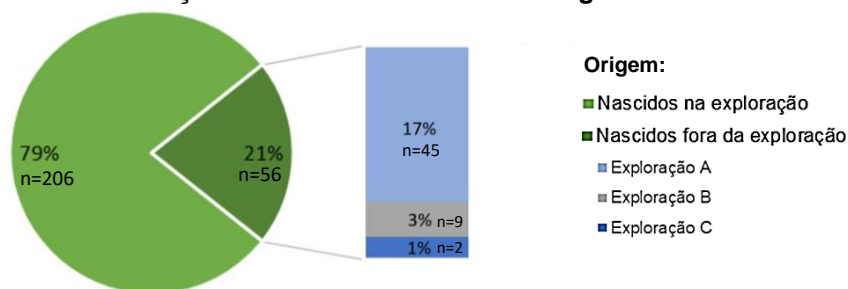


Gráfico 4 – Distribuição dos animais conforme a idade (anos)

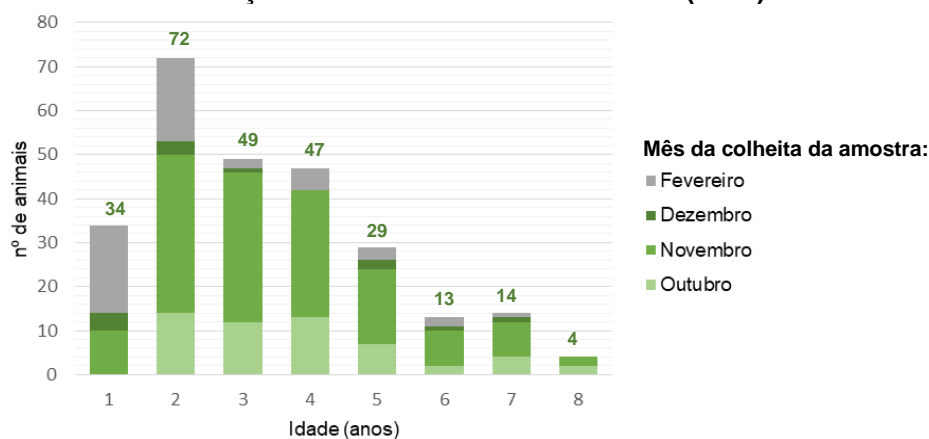
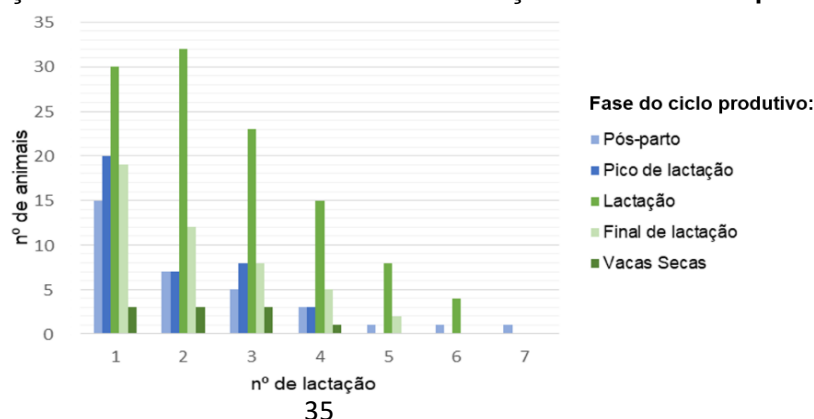


Gráfico 5 – Distribuição dos animais conforme o nº de lactação e fase do ciclo produtivo



5.5. Imunofluorescência Indireta (IFAT)

5.5.1. Produção de taquizoítos

Para obtenção de suspensão de antígeno para o revestimento das lâminas para a prova de IFAT foi utilizado o isolado Bb1Évora03, propagado em células Vero (Figura 8; Cortes et al. 2006c). O isolado encontrava-se criopreservado em azoto líquido, com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 20%, e foi seguidamente descongelado. Para a produção de antígeno foi necessário manter culturas de células infetadas com taquizoítos e células não infetadas. O número e a dimensão dos frascos de culturas infetados e não-infetados utilizados foram determinados em função das necessidades de produção de antígeno.

As células Vero foram mantidas em placas de Petri contendo meio DMEM suplementado com SBF a 10%. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos T25 e inoculadas com taquizoítos de *B. besnoiti*.

As culturas foram incubadas numa estufa a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. O crescimento das culturas foi avaliado diariamente através da observação num microscópio invertido com contraste de fase.

As células Vero não infetadas foram subcultivadas a cada 2-3 dias por tripsinização do tapete celular, previamente lavadas com PBS pH 7,4.

Para produção de células infetadas, os taquizoítos obtidos a partir do sobrenadante de culturas de células anteriormente infetadas e as células Vero não infetadas foram recolhidos para tubos *Falcon* de 50 ml e contados em câmaras de Neubauer, corados com azul tripano. Em conjunto, foram inoculados em frascos de T25 ou T75 com quantidades proporcionais à sua dimensão. Os frascos de T25 foram inoculados com 3×10^6 taquizoítos e 4×10^5 células Vero e os frascos de T75 com 9×10^6 taquizoítos e 12×10^5 células Vero. Este procedimento foi repetido a cada 4 dias até obter-se a quantidade necessária de antígeno.

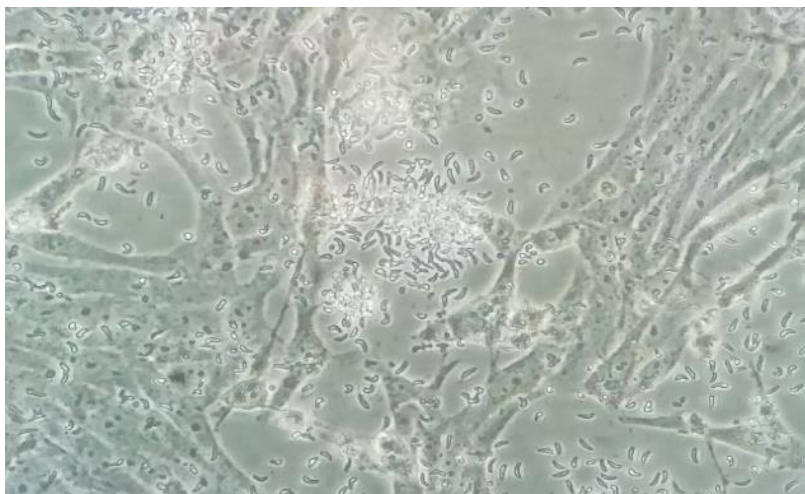


Figura 8 – Taquizoítos de *B. Besnoiti* em culturas de células Vero (fotografia original)

5.5.2. Purificação de taquizoítos

Os sobrenadantes das culturas infectadas com taquizoítos extracelulares foram recolhidos ao fim de 4 dias para tubos *Falcon* de 50 ml e purificados posteriormente por centrifugação diferencial (Figura 9; Dempster 1984). Para separação de células e detritos celulares foi utilizada uma centrifugação a 30 x g durante 5 minutos. Para precipitação de taquizoítos de *B. besnoiti*, o sobrenadante foi novamente centrifugado num tubo *Falcon* de 50 ml a 800 x g durante 10 minutos. O sedimento foi recolhido para um tubo *Eppendorf* e centrifugado a 800 x g por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 200 µl de formalina a 1% e centrifugou-se novamente. Os taquizoítos foram preservados em formalina 1% até à preparação das lâminas de IFAT.

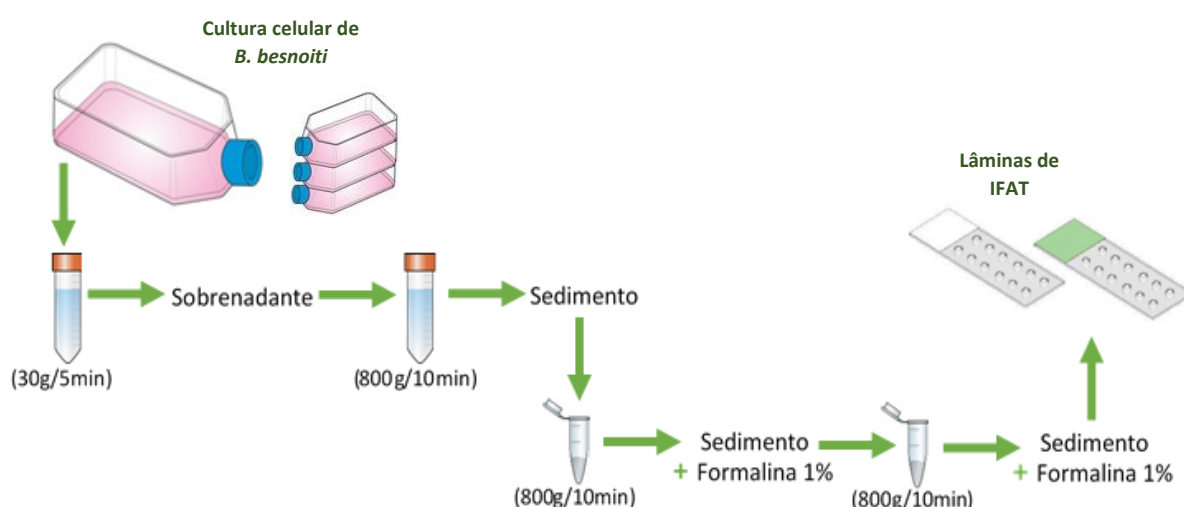


Figura 9 – Purificação de taquizoítos de *B. besnoiti* por centrifugação diferencial para obtenção de suspensão de antígeno para as lâminas de IFAT (figura original)

5.5.3. Preparação de lâminas de IFAT

As lâminas de IFAT foram sensibilizadas no passo anterior com recurso a formalina a 1%. Os parasitas foram contados numa câmara de Neubauer e diluídos em PBS à concentração de $3,5 \times 10^6$ taquizoítos/ml.

A suspensão de antígeno foi distribuída por 12 gotas de 6 µl sobre lâminas de microscopia ótica. As lâminas foram secas a 37°C durante 10 minutos numa estufa seca e posteriormente fixadas com acetona refrigerada a -20°C durante 10 minutos. Cada poço das lâminas foi delimitado com um marcador. As lâminas foram armazenadas a -20°C até à realização do ensaio.

5.5.4. Método de ensaio

As lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente e lavadas uma vez com água destilada de forma a remover os sais de fosfato presentes.

Os soros testados foram diluídos em PBS de forma a obter três diluições de cada amostra, 1:125, 1:250 e 1:500, que foram depositadas 20 µl em cada poço das lâminas de IFAT. As lâminas foram incubadas numa estufa húmida durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada durante 3 a 5 minutos. Posteriormente, foram secas com o auxílio de um secador. Foi aplicado a cada poço 20 µl de conjugado antibovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Serotec AA123F) diluído a 1:280. As lâminas foram novamente incubadas durante 1 hora e lavadas com água destilada, como descrito anteriormente. Após a secagem, procedeu-se à montagem das lâminas com glicerol a 90%, para observação num microscópio de fluorescência.

A leitura dos resultados foi feita por dois observadores independentes, numa ampliação de 400 x (Figura 10A). A diluição de *cut-off* considerada foi de 1:250 (Shkap et al. 2002). Os resultados foram considerados positivos na presença de fluorescência brilhante em torno da membrana externa dos taquizoítos e classificados como negativos na presença parcial ou ausência de fluorescência.

Neste ensaio foi utilizado um controlo negativo, obtido de um animal proveniente de uma exploração leiteira de uma região geográfica sem casos de besnoitiose descritos, e um controlo positivo, obtido a partir de um animal infetado testado em ensaios de IFAT anteriores. Ambos os controlos foram diluídos em PBS do mesmo modo que as amostras testadas. O controlo positivo apresentava positividade para todas as diluições (1:125, 1:250, 1:500).

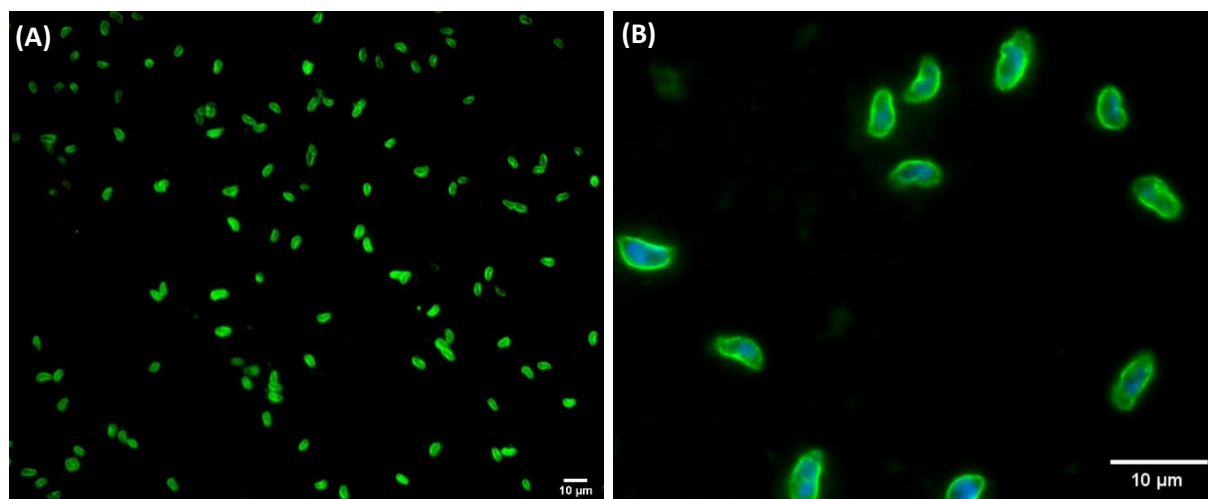


Figura 10 – Observação de um teste de imunofluorescência de um caso positivo de besnoitiose bovina em microscopia óptica com luz ultravioleta com ampliação de 400x (A); Observação dos parasitas com luz ultravioleta (verde) e marcação dos nucleos com DAPI (azul) na ampliação de 1000x (B) (fotografias originais)

5.6. Exame clínico

O exame clínico para detecção de lesões e sinais clínicos de besnoitiose bovina foi realizado em Fevereiro de 2021. No total foram avaliados clinicamente 211 animais, tendo sido observada a esclera e conjuntiva de 96 vacas.

Numa primeira abordagem, os animais foram examinados de forma rápida e sistemática nos parques. Os achados clínicos foram registados numa folha de campo (Anexos 9 a 14). Foram avaliadas alterações dermatológicas na face (Figura 11), pescoço (Figura 12), peito, dorso, tórax, membros (Figuras 13 e 15), cascos (Figura 15) e úbere (Figura 14). A estas lesões atribuiu-se uma pontuação de 0 a 3 conforme a gravidade das mesmas (Anexo 14). Avaliando as pontuações destas lesões, através de uma média aritmética (\bar{X}), foi atribuída uma classificação total das lesões cutâneas, dividida em diferentes categorias: sinais cutâneos ausentes ($\bar{X}=0$), alterações cutâneas ligeiras não significativas ($0<\bar{X}<1$) e sinais cutâneos presentes ($\bar{X}\geq 1$), classificados em grau I ($1\leq\bar{X}<2$), II ($2\leq\bar{X}<3$) e III ($\bar{X}\geq 3$). Para efeitos estatísticos, apenas os animais com classificação total correspondente a sinais cutâneos presentes ($\bar{X}\geq 1$) de grau I a III foram considerados como clinicamente afetados. A condição corporal, grau de claudicação (Figura 19), presença de corrimento nasal ou ocular e outros achados clínicos (Figuras 17 e 18) também foram registados no mesmo momento

Numa segunda abordagem, durante a ordenha, como o auxílio de uma lanterna frontal, procedeu-se à detecção de quistos na conjuntiva da esclera (Figura 16) e de linfadenomegália, bem como a observação mais cuidada das alterações clínicas anteriormente avaliadas.

5.7. Análise estatística

Os parâmetros produtivos mencionados, as informações individuais dos animais, as observações do exame clínico e os resultados laboratoriais obtidos na prova de IFAT foram colocados numa base de dados através do programa Excel (Microsoft Office 2013®). Os dados recolhidos foram analisados através da expansão R Commander do Software R®.

A prevalência aparente dos animais testados foi calculada por: (n° de animais seropositivos/ n° de animais testados) x100. A prevalência aparente do efetivo em produção testado foi calculada por: (n° de animais seropositivos em produção/ n° de animais em produção testados) x100. A prevalência real foi calculada, ajustando a prevalência aparente à sensibilidade e especificidade do teste, através do programa EpiTools.

Para identificação de associações estatísticas entre duas variáveis qualitativas, numa primeira abordagem, recorreu-se ao teste de Qui-quadrado. As variáveis foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade de significância (valor- p) era menor ou igual a 0,05, para um intervalo de confiança (IC) de 95%. Foi possível determinar também o *odds ratio* (OR), isto é, o risco relativo de um acontecimento em relação a outro.

Numa segunda abordagem, foram ajustados modelos de regressão logística multivariada para explorar o padrão epidemiológico da besnoitiose bovina, estabelecendo uma relação entre uma variável dependente e um conjunto de variáveis independentes. Um modelo linear generalizado foi realizado para verificar a influência dos fatores individuais, tais como origem, idade ou número de lactação e fase do ciclo produtivo (variáveis independentes) nos resultados obtidos na prova de IFAT (variável dependente). Um segundo modelo foi executado considerando as mesmas variáveis independentes e como variável dependente a presença de sinais clínicos cutâneos ou de quistos escleroconjuntivais. Em ambos os modelos, entre as características individuais, apenas a origem, idade e fase do ciclo produtivo foram considerados, uma vez que sexo e raça foram os mesmos para todos os animais da amostra.

Utilizando também um modelo de regressão logística multivariada, a influência dos fatores individuais em conjunto com resultados obtidos na prova de IFAT e presença de sinais clínicos (variáveis independentes) foi determinada para cada parâmetro reprodutivo e produtivo (variáveis dependentes).



Figura 11 – Alterações dermatológicas da face e região periocular classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A,B e C) (fotografias originais)



Figura 12 – Alterações dermatológicas região do pescoço classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A, B e C); Espessamento evidente da pele (D) (fotografias originais)



Figura 13 – Alterações dermatológicas nos quartos posteriores (fotografias originais)

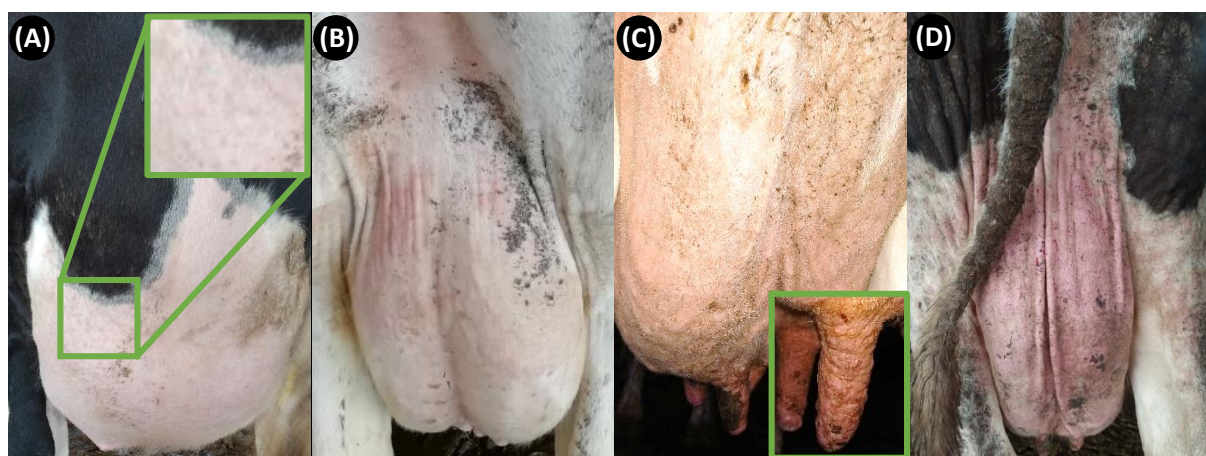


Figura 14 – Alterações dermatológicas no úbere classificadas por ordem crescente de 1 a 3 (A, B e C); Úbere com lesões cutâneas evidentes e escoriações (D) (fotografias originais)

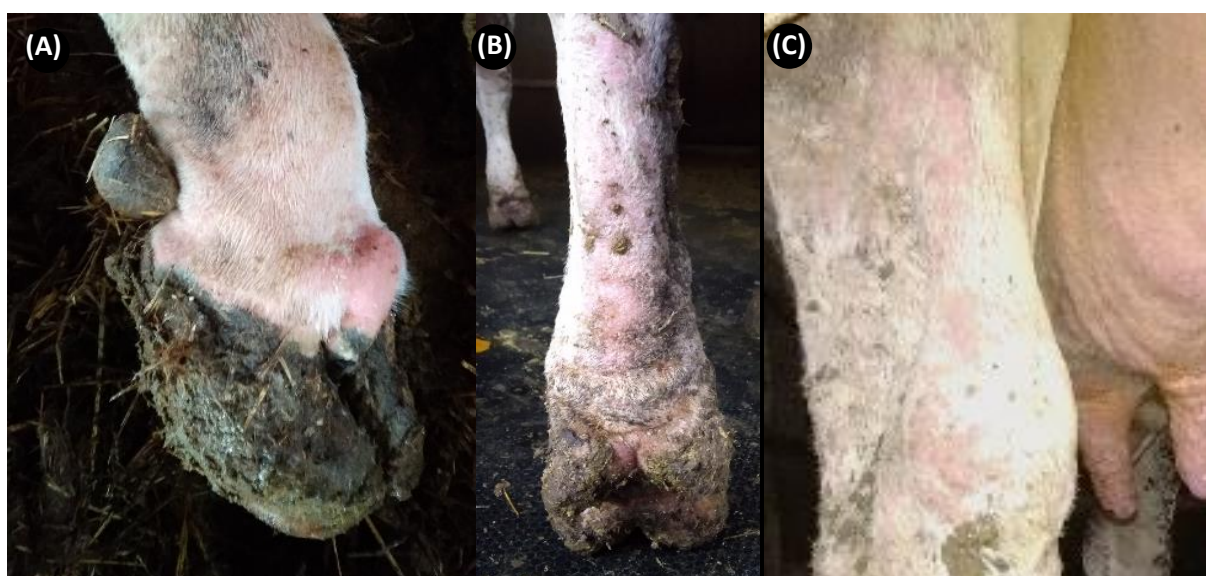


Figura 15 – Lesões nos cascos (A e B) e membros posteriores (C) (fotografias originais)

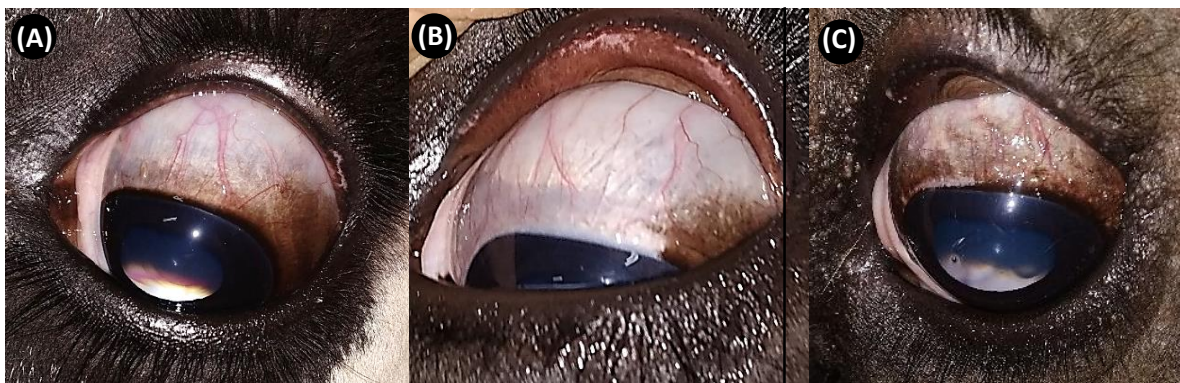


Figura 16 – Quistos na conjuntiva e esclera em quantidade crescente (fotografias originais)



Figura 17 – Presença de seborreia (fotografias originais)



Figura 18 – Presença de lesões nodulares evidentes na face e região do pescoço (fotografias originais)



Figura 19 – Caso clínico de besnoitiose com claudicação de grau IV (fotografia original)

6. Resultados

6.1. Caracterização serológica

6.1.1. Prevalência aparente e prevalência real

Os anticorpos contra *B. besnoiti* foram pesquisados através de uma prova de IFAT num total de 262 amostras, cuja prevalência aparente foi de 55,3%. Considerando apenas o efetivo em lactação (n=239), a prevalência aparente foi de 59,0%.

A prevalência real dos animais seropositivos foi calculada de acordo com a sensibilidade (89,6%) e especificidade (99,7%) do teste de IFAT, tendo sido esta de 61,6%, para um IC 95% (54,9-68,8%). No efetivo em produção a prevalência real foi de 65,7%, para um IC 95% (58,6-72,5%).

6.1.2. Resultados da prova de IFAT conforme a idade

A distribuição de animais seropositivos e seronegativos conforme a idade encontra-se representada na tabela 3. A porção entre animais testados e animais seropositivos distribuídos por idade pode ser verificada no gráfico 7. A prevalência de animais seropositivos conforme a idade, isto é, (nº de animais seropositivos da idade/ nº de animais testados da idade) x100, pode ser averiguada no gráfico 6.

Os animais mais velhos tiveram uma prevalência significativamente maior ($X^2=25,061$; $p < 0,05$), sugerindo que a idade é um fator de risco para a infecção por *B. besnoiti*.

Tabela 3 – Resultados da prova de IFAT conforme a idade dos animais testados

	Negativo (%)		Positivo (%)	
1	28	82,4%	6	17,6%
2	33	45,8%	39	54,2%
3	17	34,7%	32	65,3%
4	19	40,4%	28	59,6%
5	10	34,5%	19	65,5%
6	4	30,8%	9	69,2%
7	5	35,7%	9	64,3%
8	1	25,0%	3	75,0%
Testados	117	44,7%	145	55,3%

Gráfico 6- Seroprevalência conforme a idade

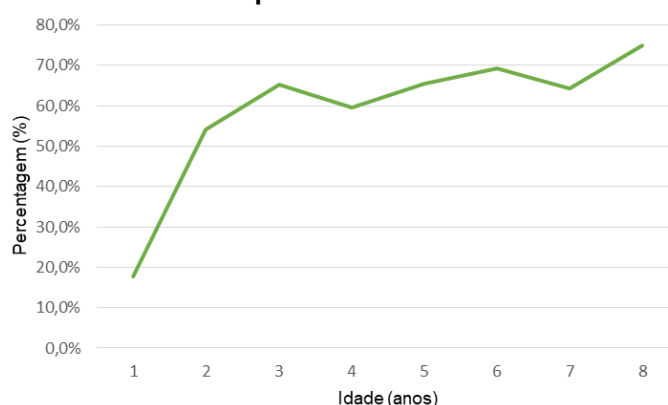
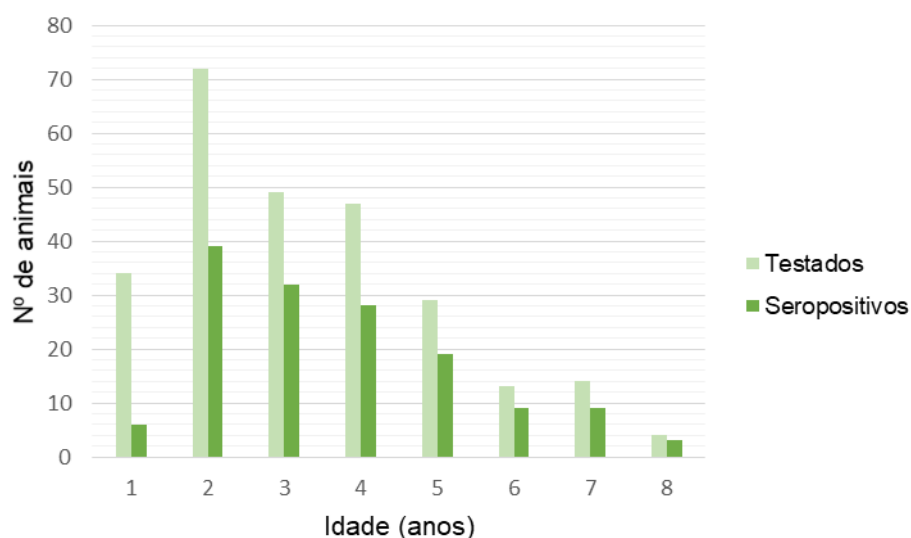


Gráfico 7 – Animais testados e seropositivos conforme a idade



6.1.3. Resultados da prova de IFAT conforme o número de lactações e fase do ciclo produtivo

A distribuição de animais seropositivos e seronegativos conforme o número de lactações e a fase do ciclo produtivo encontra-se representada nas tabelas 4 e 5, respectivamente. A proporção de animais testados e animais seropositivos distribuídos por estes parâmetros pode ser verificada nos gráficos 8 e 9, respectivamente.

Através do teste de Qui-quadrado, verificou-se que o número de lactações não teve influência significativa na seroprevalência ($X^2=8,8812$; $p= 0,1804$), no entanto, a fase do ciclo produtivo demonstrou ter influência no estado serológico dos animais ($X^2=18,495$; $p < 0,05$).

Tabela 4 – Resultados da prova de IFAT conforme o número de lactação dos animais testados

	Negativo (%)		Positivo (%)	
1	41	47,1%	46	52,9%
2	30	49,2%	31	50,8%
3	15	31,9%	32	68,1%
4	7	25,9%	20	74,1%
5	4	36,4%	7	63,6%
6	1	20,0%	4	80,0%
7	0	0,0%	1	100,0%
Testados	98	41,0%	141	59,0%

Tabela 5 – Resultados da Resultados da prova de IFAT conforme a fase do ciclo produtivo

	Negativo (%)		Positivo (%)	
Pós-parto	18	54,5%	15	45,5%
Pico de lactação	15	39,5%	23	60,5%
Lactação	46	41,1%	66	58,9%
Final da lactação	15	32,6%	31	67,4%
Secagem	4	40,0%	6	60,0%
Testados	98	41,0%	141	59,0%

Gráfico 8 – Animais testados e seropositivos conforme o número de lactações

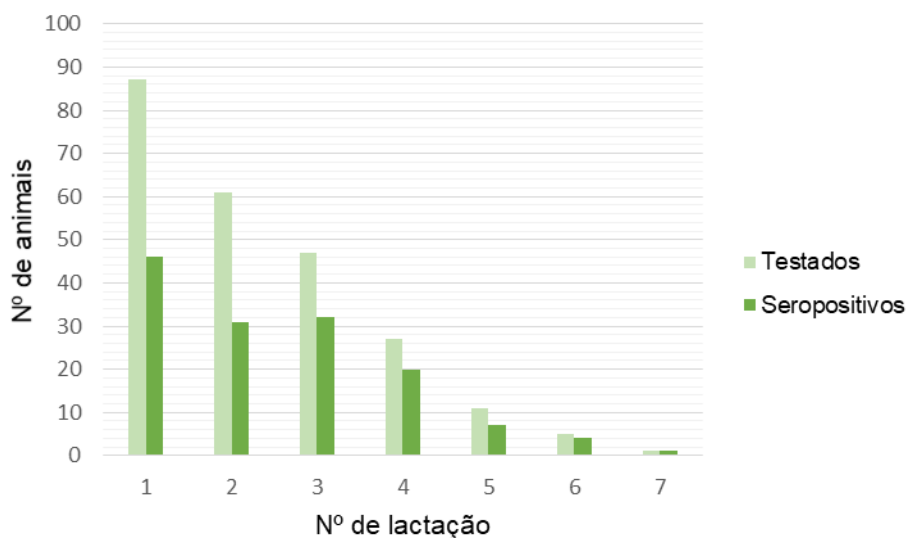
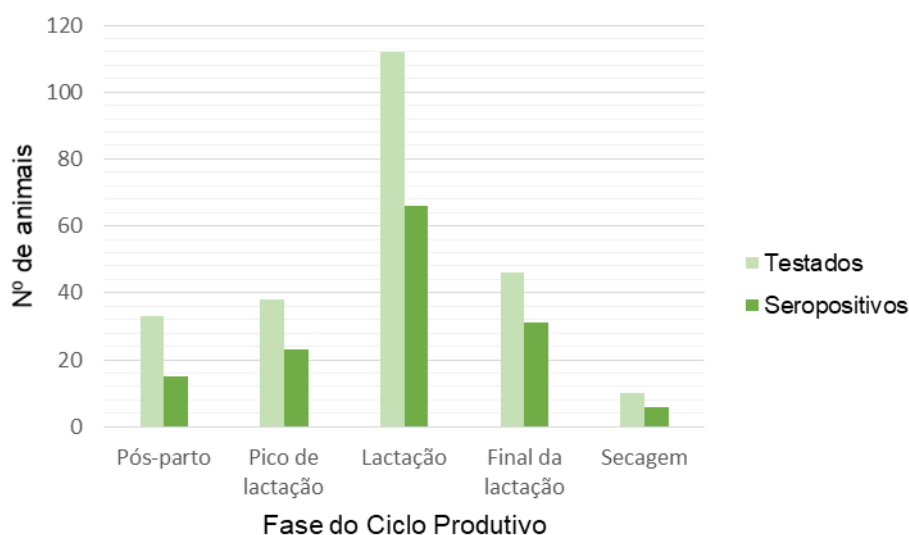


Gráfico 9 – Animais testados e seropositivos conforme a fase do ciclo produtivo



6.1.4. Resultados da prova de IFAT conforme a origem

Os animais nascidos na exploração do estudo apresentaram maior seroprevalência relativamente aos animais provenientes de explorações exteriores (Tabela 6).

De acordo com o teste de Qui-quadrado, a origem dos animais representa um fator de risco, pois a seroprevalência foi significativamente maior nos animais nascidos dentro da exploração ($X^2=4,4931$; $p < 0,05$). A probabilidade de um animal se encontrar infetado evidenciou ser 1,89 vezes maior nos animais nascidos na exploração do estudo ($OR=1,89$).

Tabela 6 – Resultados da Resultados da prova de IFAT conforme a origem

	Negativo	(%)	Positivo	(%)
Nascido na exploração	85	41,3%	121	58,7%
Nascido fora da exploração	32	57,1%	24	42,9%
Testados	117	44,7%	145	55,3%

6.1.5. Análise multivariada (regressão logística múltipla)

Na regressão logística multivariada, considerando o resultado da prova de IFAT como variável dependente, verificou-se que a idade continuou a representar um fator de risco, isto é, por cada ano de idade extra os animais apresentaram um risco de 1,3 vezes superior de estarem infetados. Verificou-se também que as novilhas evidenciaram 4,8 vezes menor risco de se encontrarem infetadas por *B. besnoiti* relativamente às vacas em lactação (Tabela 7).

Averiguou-se que os animais nascidos na exploração do estudo apresentaram um risco 3,8 vezes superior de estarem infetados relativamente aos animais provenientes de explorações exteriores (Tabela 7).

Apesar de não ser estatisticamente significativo, verificou-se a probabilidade das vacas no período pós-parto evidenciarem anticorpos específicos contra o parasita foi 2 vezes menor comparativamente às vacas em fase de lactação (Tabela 7).

Tabela 7 – Regressão logística: resultado da prova de IFAT em função das variáveis idade, origem e fase do ciclo produtivo

Fator	Classe	Odds Ratio Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,33	1,10	1,64	<0,01
Origem	Outra	3,84	1,93	7,91	<0,001
	Estudo				
Fase	Lactação	1,357	0,65	2,93	0,424
	Fim da lactação				
	Secagem	1,216	0,31	5,29	0,782
	Pós-parto	0,582	0,25	1,34	0,205
	Pico de lactação	1,019	0,46	2,29	0,961
	Novilha	0,207	0,05	0,67	<0,05

6.2. Caracterização clínica

6.2.1. Quistos na conjuntiva e esclera

A avaliação da conjuntiva e esclera foi realizada em 96 animais durante a ordenha, entre os quais 46 vacas (48 %) apresentaram quistos patogénicos nesta localização (Gráfico 10). A proporção do resultado da avaliação da esclera e conjuntiva atribuído a cada animal examinado no exame clínico geral (n=211) conforme a idade encontra-se ilustrada no gráfico 11. Contudo, através do teste de Qui-quadrado, a presença de quistos não se encontrou relacionada com os fatores individuais, isto é, com a idade, exploração de origem e fase do ciclo produtivo.

Verificou-se que 39 animais seropositivos examinados nesta localização apresentavam quistos. Estes quistos patogénicos também foram observados em 7 animais seronegativos. No gráfico 13 encontram-se representados os resultados da avaliação da esclera e conjuntiva conforme o estado serológico dos animais. Averiguou-se que os animais que apresentavam quistos escleroconjuntivais ao exame clínico tiveram uma seroprevalência significativamente maior ($X^2 = 15,754$; $p < 0,05$).

Gráfico 10 – Resultados do exame à conjuntiva e esclera para pesquisa de quistos

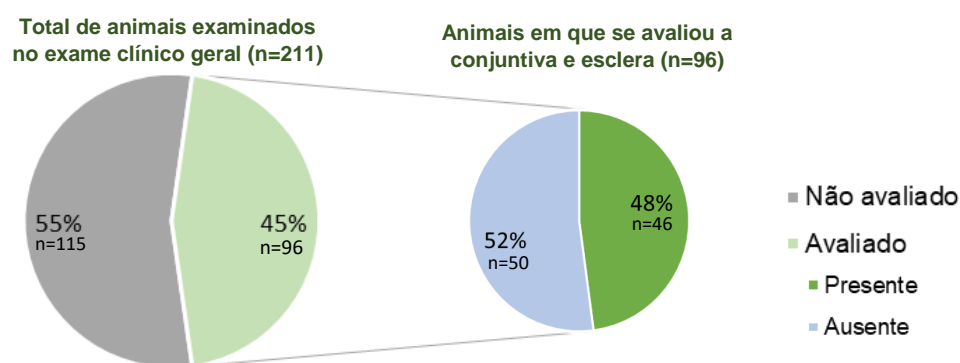


Gráfico 11 – Resultados do exame à conjuntiva dos animais examinados no exame clínico geral conforme a idade

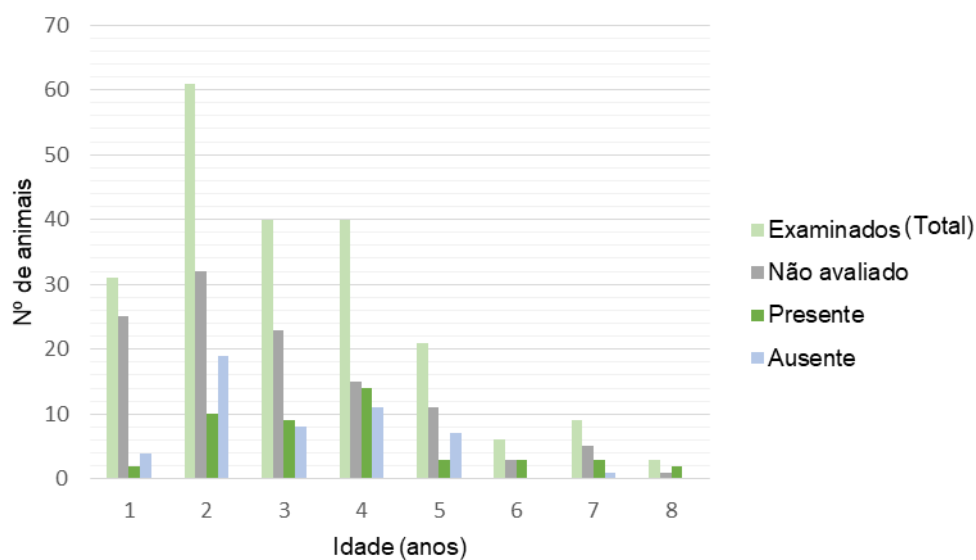
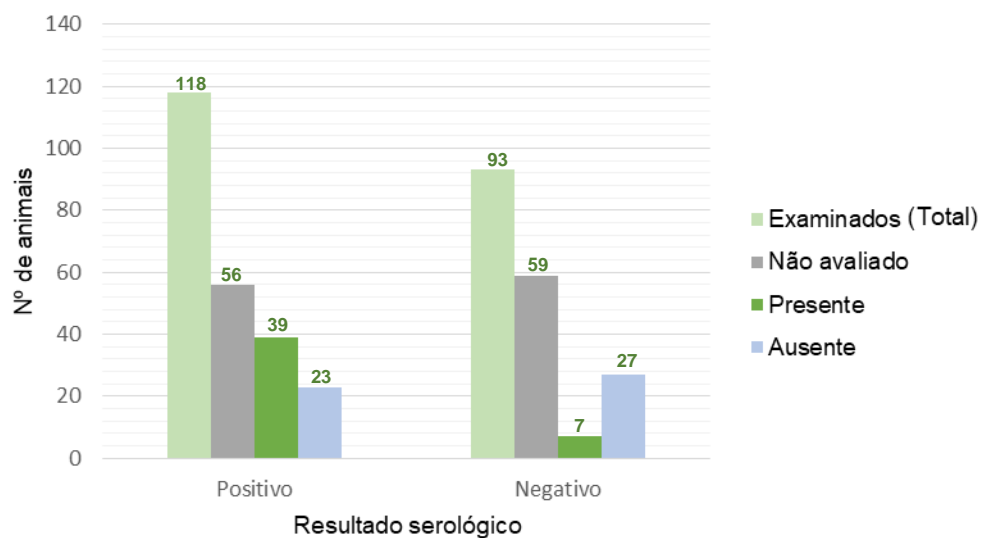


Gráfico 12 – Resultados do exame à conjuntiva dos animais examinados no exame clínico geral conforme o resultado serológico



6.2.2. Sinais e lesões cutâneas

A avaliação de lesões cutâneas foi efetuada em 211 animais, dos quais 16 vacas (8%) demonstraram lesões cutâneas evidentes (Gráfico 13). Relativamente à classificação das alterações nestes animais, 50% (n=8) apresentaram lesões de grau I, 37% (n=6) evidenciaram lesões de grau II e 13% (n=2) encontravam-se gravemente afetados (grau III). A distribuição dos resultados da avaliação das lesões cutâneas conforme a idade dos animais pode ser observada no gráfico 14. Através do teste de Qui-quadrado, verificou-se que os sinais clínicos dermatológicos manifestaram-se sobretudo nos animais mais velhos ($X^2 = 29,962$; $p < 0,05$).

No gráfico 15 verifica-se os resultados dos sinais dermatológicos conforme o resultado do teste serológico. Demonstrou-se que os animais que apresentaram lesões cutâneas demonstraram uma seroprevalência significativamente maior ($X^2 = 15,909$; $p < 0,05$).

Gráfico 13 – Classificação total das lesões cutâneas dos animais examinados

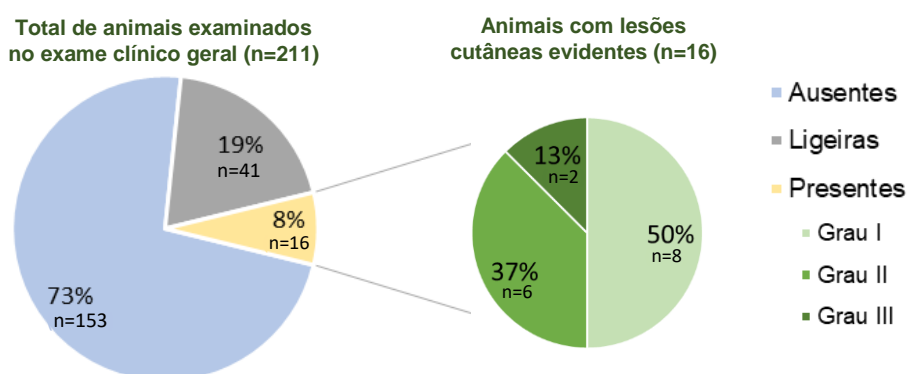


Gráfico 14 – Classificação total das lesões cutâneas dos animais examinados por idade

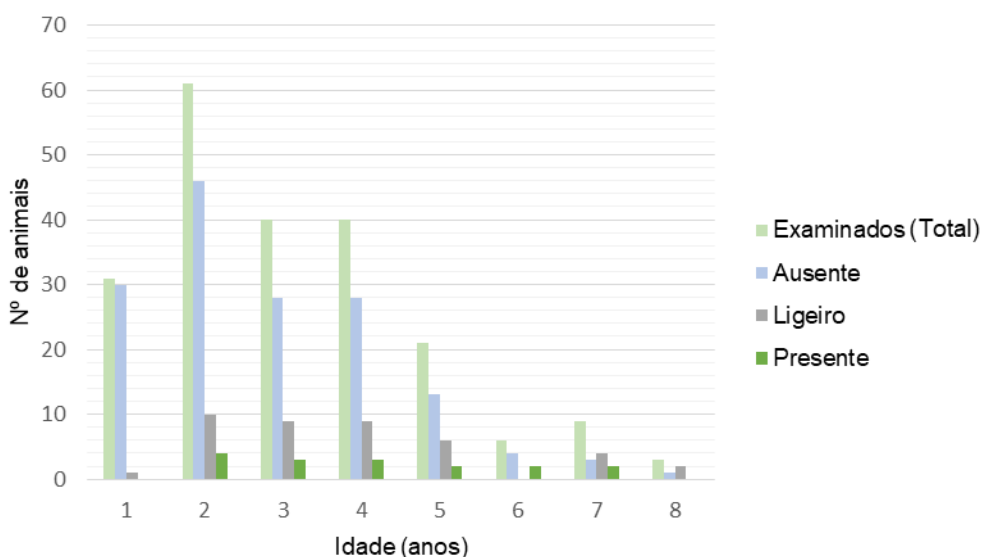
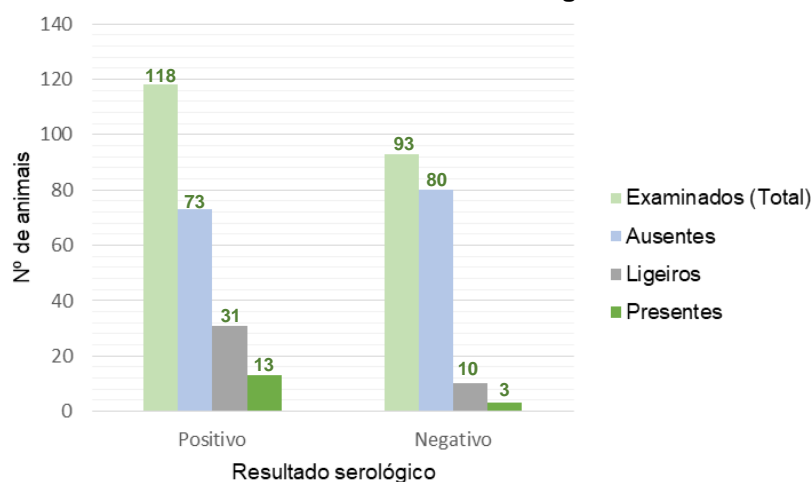


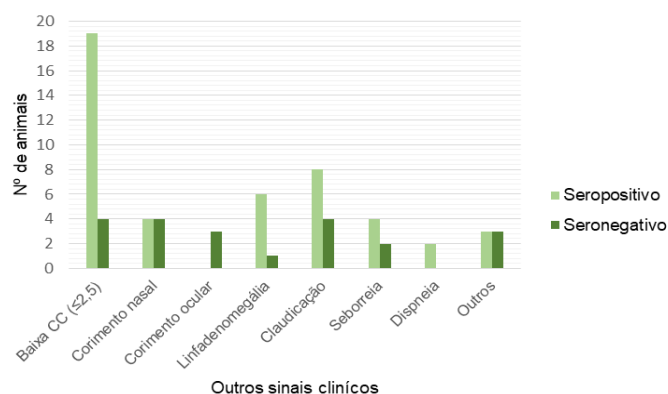
Gráfico 15 – Classificação total dos sinais clínicos cutâneos dos animais examinados conforme o resultado serológico



6.2.3. Outros achados clínicos

Outros achados clínicos encontrados encontram-se representados no gráfico 16, distribuídos conforme o resultado do teste serológico. Estes sinais clínicos não se encontraram relacionados com os fatores individuais nem com o resultado serológico. No entanto, apesar de ser variável conforme diversos fatores (fase produtiva, idade, doenças, etc.), a condição corporal baixa demonstrou estar associada com a idade ($X^2 = 21,295$; $p < 0,05$) e seropositividade ($X^2 = 7,457$; $p < 0,05$) (Anexo 5).

Gráfico 16 – Animais seropositivos e seronegativos conforme a presença de outros achados clínicos



6.2.4. Análise multivariada

Numa regressão logística multivariada, considerando a presença de quistos na conjuntiva e esclera como variável dependente, verificou-se uma associação significativa com a seropositividade ($p < 0,05$). Apesar de não ser estatisticamente significativo, contabilizou-se um maior número de animais mais velhos com quistos escleroconjuntivais (Anexo 4).

Relativamente às lesões cutâneas, não foi encontrada nenhuma associação significativa com os fatores individuais ou com o resultado do teste serológico. A diminuição da condição corporal apresentou associação com a idade das vacas, mas não com o estado serológico (Anexo 6).

6.3. Avaliação dos parâmetros produtivos do contraste leiteiro

A descrição estatística dos parâmetros relativos à produção leiteira encontra-se representada na tabela 8, conforme o estado serológico dos animais (seropositivo e seronegativo) e presença de sinais clínicos crônicos de besnoitiose bovina (quistos na conjuntiva e esclera e sinais cutâneos).

Tabela 8 – Estatística descritiva (média, desvio padrão, mínimo e máximo) dos parâmetros da produção leiteira de acordo com o resultado serológico e presença de sinais clínicos

	Nº de animais	Grupo	Média (σ)	Min.	Max.
Produção diária (kg)	98	Seronegativo	33,9 (8,7)	8,7	56,8
	141	Seropositivo	34,9 (8,2)	8,1	56,6
	46	Quistos na esclera	37,4 (8,7)	8,6	56,8
	16	Sinais cutâneos	36,9 (9,4)	9,4	56,8
	239	Total	34,6 (8,4)	8,4	56,8
Variação na produção diária (kg)	98	Seronegativo	14,2 (0,1)	9,0	40,8
	141	Seropositivo	15,7 (1,3)	8,5	37,8
	46	Quistos na esclera	18,8 (2,6)	9,8	37,8
	16	Sinais cutâneos	18,5 (5,7)	10,2	37,4
	239	Total	15,0 (0,1)	8,8	40,8
Produção estimada aos 305 dias (kg)	98	Seronegativo	10415 (5886)	1626	14802
	141	Seropositivo	10707 (7487)	1682	15613
	46	Quistos na esclera	10982 (7815)	1677	14433
	16	Sinais cutâneos	10555 (7815)	1834	14433
	239	Total	10587 (5866)	1665	15613
Teor de gordura (%)	98	Seronegativo	4,38 (1,97)	0,85	7,62
	141	Seropositivo	4,48 (2,28)	0,86	6,72
	46	Quistos na esclera	4,64 (3,10)	0,82	6,72
	16	Sinais cutâneos	4,62 (3,34)	0,83	6,16
	239	Total	4,44 (1,97)	0,86	7,62
Teor de proteína (%)	98	Seronegativo	3,38 (2,69)	0,29	4,02
	141	Seropositivo	3,38 (2,62)	0,34	4,56
	46	Quistos na esclera	3,35 (2,72)	0,31	4,16
	16	Sinais cutâneos	3,30 (2,77)	0,26	3,86
	239	Total	3,38 (2,69)	0,32	4,56
Contagem de células somáticas (x1000 células/ml)	98	Seronegativo	186 (10)	264	1889
	141	Seropositivo	303 (13)	615	5038
	46	Quistos na esclera	370 (14)	820	5038
	16	Sinais cutâneos	319 (14)	518	2223
	239	Total	255 (10)	505	5038
Ureia (mg/kg)	98	Seronegativo	271 (178)	47	414
	141	Seropositivo	275 (144)	47	390
	46	Quistos na esclera	269 (328)	50	607
	16	Sinais cutâneos	266 (187)	42	351
	239	Total	273 (144)	47	414

6.3.1. Produção média diária (kg)

A média de produção diária do efetivo ao longo do estudo foi de 34,6 kg/dia. As vacas seropositivas ou com presença de sinais clínicos crônicos (quistos na esclera ou lesões cutâneas) evidenciaram uma produção média diária ligeiramente mais elevada (Tabela 8).

No entanto, através da regressão logística multivariada, o resultado serológico e a presença de sinais clínicos não apresentaram influência estatisticamente significativa neste parâmetro. A produção diária demonstrou ser significativamente variável com a idade e fase do ciclo produtivo (Tabela 9, 10 e 11).

Tabela 9 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,01	0,38	1,64	<0,01
	Outra				
Origem	Estudo	1,28	-1,12	3,68	0,298
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-9,81	-12,31	-7,32	<0,001
	Secagem	-8,65	-13,37	-3,96	<0,001
	Pós-parto	1,49	-1,43	4,40	0,319
	Pico de lactação	1,70	-1,05	4,45	0,227
IFAT	Negativo				
	Positivo	1,08	-0,88	3,03	0,280

Tabela 10 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,59	23,04	33,58	<0,01
	Outra				
Origem	Estudo	3,12	-0,55	6,78	0,099
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-6,09	-10,32	-1,87	<0,01
	Secagem	-9,92	15,61	-4,23	<0,001
	Pós-parto	1,37	-2,98	5,72	0,539
	Pico de lactação	2,27	-1,29	5,82	0,215
Quistos	Ausentes				
	Presentes	1,65	-1,20	4,50	0,261

Tabela 11 – Regressão logística: Produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,62	0,89	2,34	<0,001
	Outra				
Origem	Estudo	1,89	-0,71	4,49	0,156
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-9,81	-12,58	-7,03	<0,001
	Secagem	-8,34	-13,44	-3,24	<0,01
	Pós-parto	0,81	-2,31	3,92	0,613
	Pico de lactação	1,89	-1,23	4,50	0,155
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	0,01	-3,73	3,74	0,997

6.3.2. Variação da produção média diária (kg)

As vacas com quistos na esclera ou alterações cutâneas crônicas evidenciaram maiores variações na produção diária, de acordo com a descrição estatística da tabela 8.

Através da regressão logística multivariada, verificou-se que os animais com quistos escleroconjuntivais apresentaram variações significativamente maiores neste parâmetro (Tabela 13).

O estado serológico e a presença de lesões cutâneas não evidenciaram influência estatisticamente significativa na variação da produção média diária (Tabelas 11 e 14).

Tabela 12 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,62	0,89	2,36	<0,001
	Outra				
Origem	Estudo	1,66	-1,09	4,42	0,237
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-2,53	-5,41	0,34	0,086
	Secagem	1,80	-3,58	7,17	0,513
	Pós-parto	0,97	-2,69	4,62	0,605
	Pico de lactação	-4,13	-7,28	-0,98	<0,05
IFAT	Negativo				
	Positivo	0,83	-1,45	3,11	0,478

Tabela 13 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	1,05	-0,13	2,23	0,085
	Outra				
Origem	Estudo	0,28	-4,19	4,76	0,901
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-6,53	-11,69	-1,37	<0,05
	Secagem	0,22	-6,72	7,17	0,950
	Pós-parto	-0,37	-5,89	5,15	0,897
	Pico de lactação	-3,56	-7,90	0,78	0,112
Quistos	Ausentes				
	Presentes	5,97	2,48	9,45	<0,01

Tabela 14 – Regressão logística: Variação da produção diária (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	2,02	1,15	2,88	<0,001
	Outra				
Origem	Estudo	0,93	-2,31	3,99	0,551
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-2,23	-5,50	1,04	0,184
	Secagem	3,16	-2,86	9,17	0,305
	Pós-parto	1,72	-2,24	5,68	0,395
	Pico de lactação	-3,24	-6,64	0,14	0,062
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	1,40	-3,01	5,81	0,535

6.3.3. Produção estimada aos 305 dias (kg)

A média da produção estimada aos 305 dias no efetivo foi de 10587 kg. As vacas seropositivas ou com quistos na esclera evidenciaram valores ligeiramente mais elevados na estatística descritiva apresentada na tabela 8.

Através da regressão logística multivariada, verificou-se que a produção estimada aos 305 dias aumentava 400,78 litros por cada ano de idade e que os animais nascidos na exploração do estudo produziam mais 1129,54 litros comparativamente às vacas provenientes de outras explorações (Tabela 15), no entanto, o resultado serológico e a presença de quistos escleroconjuntivais não apresentaram influência estatisticamente significativa neste parâmetro. Apesar de não ser significativo, averiguou-se que os animais com lesões cutâneas evidentes produziram menos 605 litros na produção estimada aos 305 dias (Tabela 17).

Tabela 15 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	400,78	270	531	<0,001
Origem	Outra Estudo	1129,54	626	1632	<0,001
IFAT	Negativo Positivo	-62,59	-475	350	0,767

Tabela 16 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	370,1	169	570	<0,001
Origem	Outra Estudo	1057,4	294	1819	<0,001
Quistos	Ausentes Presentes	316,8	-273	907	0,296

Tabela 17 – Regressão logística: Produção estimada aos 305 dias (Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	477,67	326	9081	<0,001
Origem	Outra Estudo	989,06	440	1537	<0,001
Lesões cutâneas	Ausentes Presentes	-605,00	-1392	182	0,134

6.3.4. Teor de gordura (%)

O teor de gordura presente no leite demonstrou estar significativamente associado à fase do ciclo produtivo, não apresentando correlação com o estado serológico do animal ou com a presença de sinais clínicos de besnoitiose bovina (Tabelas 18, 19 e 20).

Tabela 18 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,02	-0,10	0,04	0,460
	Outra				
Origem	Estudo	-0,24	-0,51	0,03	0,091
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	0,03	-0,25	0,32	0,818
	Secagem	0,62	0,62	1,17	<0,05
	Pós-parto	0,47	0,13	0,81	<0,01
	Pico de lactação	0,43	0,11	0,75	<0,01
IFAT	Negativo				
	Positivo	0,17	-0,04	0,40	0,126

Tabela 19 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,02	-0,12	0,08	0,715
	Outra				
Origem	Estudo	-0,39	-0,89	-0,07	0,064
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-0,08	-0,56	0,38	0,711
	Secagem	1,01	0,37	1,65	<0,01
	Pós-parto	0,80	0,31	1,29	<0,01
	Pico de lactação	0,41	0,01	0,81	<0,05
Quistos	Ausentes				
	Presentes	0,11	-0,20	0,43	0,480

Tabela 20 – Regressão logística: Teor de gordura (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,01	-0,10	0,07	0,755
	Outra				
Origem	Estudo	-0,13	-0,44	0,17	0,396
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	0,04	-0,29	0,37	0,813
	Secagem	0,92	0,31	1,54	<0,01
	Pós-parto	0,50	0,12	0,87	<0,05
	Pico de lactação	0,49	0,14	0,83	<0,01
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	0,13	-0,31	0,58	0,55

6.3.5. Teor de proteína (%)

De acordo com a regressão logística multivariada, o teor de proteína presente no leite demonstrou variar significativamente com a idade e com a fase do ciclo produtivo. No entanto, estado serológico do animal e a presença de sinais clínicos de besnoitiose bovina não apresentaram influência estatisticamente significativa neste parâmetro (Tabelas 21, 22 e 23).

Tabela 21 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,03	-0,05	-0,01	<0,01
Origem	Outra				
	Estudo	-0,06	-0,15	0,02	0,166
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	0,36	0,27	0,46	<0,001
	Secagem	0,14	-0,03	0,31	0,119
	Pós-parto	-0,10	-0,21	0,01	0,077
	Pico de lactação	-0,07	-0,18	0,02	0,151
IFAT	Negativo				
	Positivo	-0,004	0,07	0,06	0,910

Tabela 22 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,05	-0,09	-0,01	<0,05
Origem	Outra				
	Estudo	-0,08	-0,23	0,05	0,238
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	0,36	0,19	0,53	<0,001
	Secagem	0,10	-0,12	0,33	0,389
	Pós-parto	0,05	-0,11	0,23	0,525
	Pico de lactação	0,01	-0,13	0,15	0,913
Quistos	Ausentes				
	Presentes	0,04	-0,07	0,15	0,487

Tabela 23 – Regressão logística: Teor de proteína (%) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,04	-0,06	-0,01	<0,01
Origem	Outra				
	Estudo	-0,04	-0,14	0,04	0,315
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	0,39	0,28	0,49	<0,001
	Secagem	0,08	-0,10	0,27	0,367
	Pós-parto	-0,12	-0,24	-0,01	<0,05
	Pico de lactação	-0,04	-0,15	0,06	0,43
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	0,01	-0,13	0,14	0,896

6.3.6. Contagem de células somáticas (x1000 células/ml)

Através da descrição estatística relativa aos parâmetros produtivos representada na tabela 8, os animais com anticorpos específicos contra *B. besnoiti* ou com sinais clínicos de besnoitiose bovina (quistos escleroconjuntivais e lesões cutâneas) evidenciaram contagens de células somáticas mais elevadas.

De acordo com a regressão logística multivariada, as vacas seropositivas ou com quistos escleroconjuntivais apresentaram contagens de células significativamente mais elevadas, apresentando no leite um aumento de 140 e 304 x1000 células/ml, respetivamente (Tabelas 24 e 25). A presença de sinais clínicos não apresentou influência estatisticamente significativa na contagem de células somáticas.

Verificou-se ainda que os animais nascidos na exploração do presente estudo apresentaram contagens de células somáticas significativamente menores, comparativamente às vacas provenientes de explorações exteriores (Tabelas 24, 25 e 26).

Tabela 24 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	40,03	-2,73	82,80	0,0678
Origem	Outra				
	Estudo	-228,80	-391,47	-66,13	<0,01
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-105,94	-274,91	63,01	0,2203
	Secagem	19,79	-298,25	337,83	0,9030
	Pós-parto	-18,83	-216,70	179,03	0,8522
	Pico de lactação	96,60	-89,75	282,96	0,3107
IFAT	Negativo				
	Positivo	139,63	7,06	272,1	<0,05

Tabela 25 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-16,54446	-99,05	65,96	<0,05
Origem	Outra				
	Estudo	-426,10	-742,83	-109,37	<0,01
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-131,99	-496,96	232,97	0,48036
	Secagem	146,11	-345,61	637,82	0,56185
	Pós-parto	-40,17	-416,19	335,85	0,83466
	Pico de lactação	248,60	103,00	555,77	0,11640
Quistos	Ausentes				
	Presentes	304,27	58,20	550,34	<0,05

Tabela 26 – Regressão logística: Contagem de células somáticas (x1000 células/ml) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	12,34	-38,04	62,73	0,632
Origem	Outra				
	Estudo	-190,83	-371,96	-9,69	<0,05
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	-49,11	-242,89	144,66	0,620
	Secagem	125,85	125,84	481,43	0,489
	Pós-parto	-32,27	-249,94	185,40	0,771
	Pico de lactação	120,89	-79,32	321,09	0,238
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	113,16	-147,21	373,53	0,395

6.3.7. Ureia (mg/Kg)

De acordo com a regressão logística multivariada, o estado serológico e a presença de sinais clínicos de besnoitiose bovina não apresentaram influência significativa no teor de ureia no leite. Verificou-se ainda que o teor de ureia no leite foi significativamente menor na fase do pós-parto e no pico de lactação (Tabelas 28, 29 e 30).

Tabela 27 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-1,051	-4,90	2,80	0,593
	Outra				
Origem	Estudo	-2,343	-17,01	12,33	0,754
	Outra				
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	7,838	-7,40	23,08	0,314
	Secagem	6,263	-22,43	34,95	0,669
	Pós-parto	-34,984	-52,83	-17,13	<0,001
	Pico de lactação	-34,554	-51,36	-17,73	<0,001
IFAT	Negativo				
	Positivo	1,856	-10,10	13,81	0,761

Tabela 28 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-1,82	-8,43	4,77	0,589
	Outra				
Origem	Estudo	4,89	-20,46	30,24	0,706
	Outra				
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	15,49	-13,72	44,70	0,301
	Secagem	10,15	-29,21	49,51	0,614
	Pós-parto	-21,14	-51,24	8,95	0,172
	Pico de lactação	-35,28	-59,87	-10,69	<0,01
Quistos	Ausentes				
	Presentes	-2,67	-22,36	17,02	0,791

Tabela 29 – Regressão logística: Ureia (mg/Kg) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-1,03	-5,59	3,52	0,656
	Outra				
Origem	Estudo	2,98	-13,41	19,38	0,721
	Outra				
Fase	Lactação				
	Fim da lactação	7,13	-10,40	24,67	0,426
	Secagem	18,09	-14,08	50,28	0,271
	Pós-parto	-23,64	-43,34	-3,94	<0,05
	Pico de lactação	-30,94	-49,06	-12,82	<0,001
Lesões cutâneas	Ausentes				
	Presentes	-6,44	-30,00	17,12	0,592

6.4. Avaliação dos parâmetros reprodutivos

A descrição estatística dos parâmetros reprodutivos encontra-se representada na tabela 30, de acordo com o estado serológico dos animais (seropositivo e seronegativo) e presença de sinais clínicos crônicos de besnoitiose bovina (quistos na conjuntiva e esclera e lesões cutâneas).

Tabela 30 – Estatística descritiva (média, desvio padrão, mínimo e máximo) dos parâmetros reprodutivos de acordo com o resultado serológico e presença de sinais clínicos

	Nº de animais	Grupo	Média (σ)	Min.	Max.
Intervalo entre partos (dias)	61	Seronegativo	433 (97)	324	885
	101	Seropositivo	439 (106)	323	912
	33	Quistos na esclera	423 (79)	328	607
	10	Sinais cutâneos	365 (31)	332	424
	162	Total	436 (103)	323	912
Número de IA até à concepção	63	Seronegativo	2,7 (1,8)	1	8
	108	Seropositivo	2,9 (2,0)	1	10
	35	Quistos na esclera	2,6 (1,6)	1	7
	11	Sinais cutâneos	1,3 (0,9)	1	3
	171	Total	2,8 (1,9)	1	8

6.4.1. Intervalo entre partos (dias)

Na regressão logística multivariada, os animais com lesões cutâneas crônicas apresentaram IEP mais curtos, cerca de 69 dias (Tabela 33). O estado serológico das vacas e a presença de quistos não apresentaram influência significativa no IEP (Tabelas 31 e 32).

Tabela 31 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	8,219	-3,43	19,87	0,169
Origem	Outra	10,013	-30,84	50,86	0,632
	Estudo				
IFAT	Negativo	1,856	-32,44	36,16	0,916
	Positivo				

Tabela 32 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos escleroconjuntivais

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	3,954	-9,58	17,49	0,569
Origem	Outra	10,842	-39,37	61,05	0,674
	Estudo				
Quistos	Ausentes	17,765	-19,18	54,71	0,350
	Presentes				

Tabela 33 – Regressão logística: Intervalo entre partos (dias) em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de alterações cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	5,60	-6,39	17,59	0,361
Origem	Outra	8,56	-31,67	48,79	0,677
	Estudo				
Lesões cutâneas	Ausentes	-69,35	-130,8	-7,86	<0,05
	Presentes				

6.4.2. Número de inseminações artificiais até à concepção

O estado serológico e a presença de quistos escleroconjuntivais ou lesões cutâneas crónicas não apresentaram influência significativa no número de inseminações artificiais até à concepção (Tabelas 34, 35 e 36).

Tabela 34 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	0,08	-0,12	0,29	0,439
	Outra				
Origem	Estudo	-0,16	-0,90	0,57	0,664
	Negativo				
IFAT	Positivo	0,14	-0,47	0,76	0,655

Tabela 35 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de quistos na esclera

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,01	-0,30	0,29	0,959
	Outra				
Origem	Estudo	0,39	-0,72	1,51	0,491
	Ausentes				
Quistos	Presentes	0,15	-0,64	0,96	0,700

Tabela 36 – Regressão logística: Número de inseminações artificiais até à concepção em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e presença de lesões cutâneas

Fator	Classe	Valor Estimado	IC 95%		P
Idade	Continua	-0,01	-0,23	0,21	0,956
	Outra				
Origem	Estudo	0,01	-0,73	0,75	0,984
	Ausentes				
Lesões cutâneas	Presentes	-1,08	-2,20	0,03	0,061

6.4.3. Historial de aborto e patologia reprodutiva

De acordo com o teste de Qui-quadrado, não foi possível determinar qualquer associação significativa entre os animais com historial de aborto ou patologia reprodutiva com os resultados da prova de IFAT ou com a presença de sinais clínicos (Anexo 7).

No ano de 2020 até Março de 2021 foram registados 5 abortos, 38 metrites e 14 retenções placentárias. A distribuição destas enfermidades conforme o resultado do teste serológico encontra-se representada na tabela 37.

Tabela 37 – Patologia reprodutiva conforme o estado serológico dos animais

	Negativo (%)		Positivo (%)	
Aborto	2	40%	3	60%
Metrite	13	34%	25	66%
Retenção placentária	4	29%	10	71%

7. Discussão

7.1. Caracterização serológica

O estudo confirma a presença de *B. besnoiti* no efetivo testado, relatando infecções e casos clínicos de besnoitiose bovina numa exploração leiteira em Portugal. Nesta exploração, a seroprevalência real no efetivo com idade superior a um ano foi de 61,6% para um IC 95% (54,9-68,8%) e de 65,7% para um IC 95% (58,6-72,5%) considerando apenas as vacas em produção. Estes valores foram mais elevados do que a prevalência média intraexploração em Portugal de 33% descrita por Waap et al. (2014); no entanto, esse estudo abrangeu apenas explorações de bovinos de carne, na maioria em regime extensivo. Assim, a prevalência determinada poderá ser mais elevada pelo facto dos animais encontrarem-se em regime de produção intensivo, onde se verifica maior densidade animal e coabitação mais próxima com bovinos infetados, o que favorece uma transmissão mais eficiente por contacto direto. Os estudos relativos à besnoitiose bovina em explorações leiteiras na Europa são limitados, verificando-se valores de prevalência intraexploração variáveis (Gentile et al. 2012; Villa et al. 2019). Os valores de prevalência mais elevados entre vacas em produção estão descritos na França (89,5%) e Irlanda (82,9%) (Liénard et al. 2011; Ryan et al. 2016).

Na análise estatística, através de uma regressão logística multivariada, as variáveis relacionadas com características individuais dos animais, nomeadamente a idade e exploração de origem, influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o resultado serológico.

A idade dos animais demonstrou ser um fator de risco para a infeção por *B. besnoiti*, uma vez que a prevalência serológica foi significativamente mais elevada nos animais mais velhos, sendo 1,3 vezes mais provável de adquirir a infeção por cada ano de idade (Tabela 7). Verificou-se um contraste na seroprevalência entre as vacas com três ou mais lactações (aproximadamente 70%) e as vacas de primeira e segunda lactação (52,9% e 50,8% respetivamente) (Tabela 4). As nulíparas e primíparas (<2 anos) apresentaram menor percentagem de resultados serológicos positivos (17,6%) (Tabela 3). Estes resultados sustentam que a transmissão do protozoário ocorre por via horizontal e que é relativamente lenta. O risco de exposição a *B. besnoiti* aumenta com o tempo de coabitação com animais infetados, porém as alterações do sistema imunitário e de comportamentos defensivos contra picadas de insetos poderão aumentar a suscetibilidade dos animais mais velhos à infeção (Esteban-Gil et al. 2017). De acordo com este trabalho e com outros estudos realizados (Hornok et al. 2015), a transmissão vertical do parasita parece improvável.

Verificou-se que os animais nascidos na exploração do estudo apresentaram maior seroprevalência relativamente às vacas provenientes de explorações exteriores, tendo um risco de se encontrarem infetados 3,8 vezes superior (Tabela 7). Este fenómeno poderá estar relacionado com um período de coabitação com animais infetados mais prolongado.

Relativamente à fase do ciclo produtivo, apesar de não se ter encontrado uma relação estatisticamente significativa, os bovinos no período pós-parto tiveram 2 vezes menor probabilidade de apresentar anticorpos específicos contra *B. besnoiti*, comparativamente às vacas em fase de lactação (Tabela 7). A presença baixa de anticorpos no período pós-parto poderá ser justificada com a possibilidade da infeção ocorrer preferencialmente nesta fase, onde se verifica uma imunossupressão considerável e, conseqüentemente, uma maior suscetibilidade à infeção. Em animais recentemente infetados, os métodos de diagnóstico indiretos (serologia) poderão não evidenciar a presença de anticorpos, uma vez que a seroconversão ocorre aproximadamente 15 dias após a infeção (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). Ainda no período pós-parto, as funções imunitárias poderão estar diminuídas devida à imunossupressão, refletindo uma menor síntese de anticorpos (Burvenich et al. 2003), que poderá não atingir o limiar de deteção dos testes serológicos.

É importante também salientar que na exploração foi confirmada anteriormente a presença de outros protozoários da família Sarcocystidae, nomeadamente *Neospora caninum*. Em estudos epidemiológicos é frequente utilizar um teste de ELISA numa primeira abordagem, no entanto, estão descritas reações cruzadas com outras coccídias formadoras de quistos, o que compromete a especificidade do teste. Assim, neste estudo, optou-se por uma prova de IFAT com antígenos purificados, com uma diluição de *cut-off* de 1:250.

7.2. Caracterização clínica

O exame clínico foi realizado em Fevereiro a 211 animais. Todas as vacas clinicamente infetadas (n=16) apresentavam um quadro clínico característico da fase crónica da doença e um resultado serológico positivo, à exceção de três animais (Gráfico 15). Considerando a presença de lesões cutâneas evidentes, a prevalência clínica foi de 8%, correspondendo a valores demonstrados em explorações infetadas endemicamente (1-10%) (Álvarez-García et al. 2013). Nos animais examinados, as lesões cutâneas apresentaram um padrão semelhante ao descrito em bovinos de carne, no entanto, as lesões foram mais perceptíveis devido ao facto destas vacas possuírem uma pelagem curta e de cores neutras, característica da raça Holstein Frísia. Observou-se ainda que a pele do úbere era uma das regiões mais afetadas, para além do pescoço e membros posteriores.

A conjuntiva e esclera foi examinada em 96 animais. A presença de quistos patogénicos foi detetada em 48% (n=46) destas vacas, estando esta percentagem de acordo com os resultados descritos por Ryan et al. (2016). Os quistos escleroconjuntivais estavam presentes em 39 animais seropositivos e em 7 animais seronegativos (Gráfico 12).

A presença de sinais de esclerodermia verificada em animais seronegativos poderá ser explicada pelo facto destas amostras terem sido obtidas 4 a 3 meses antes da realização do exame clínico, pelo que a infeção poderá ter ocorrido durante esse intervalo. Uma vez que

a colheita das amostras foi realizada durante o outono e inverno, esta hipótese sustenta que podem ocorrer novas infecções fora da época de abundância de vetores, possivelmente através outras vias de transmissão, isto é, por contacto direto, por via iatrogénica ou por um ciclo biológico desconhecido. Nas explorações leiteiras, devido à grande densidade animal, existe um contacto físico muito próximo, apesar de alguns fatores de risco serem minimizados (exemplo: monta natural substituída por inseminação artificial). Para além disso, a partilha de utensílios entre animais é frequente, desde o equipamento de ordenha a agulhas.

No entanto, não foi detetada a presença de anticorpos específicos contra *B. besnoiti* numa vaca em que a amostra para serologia foi obtida no dia do exame clínico. Este animal tinha 7 anos de idade, encontrava-se no período de pós-parto e ao exame clínico apresentava lesões cutâneas evidentes, quistos na esclera, corrimento nasal serosomucoso e claudicação de grau IV (Figura 19). A ausência de anticorpos neste animal poderá ser justificada ou por uma possível infecção recente, em que os sinais clínicos podem estar presentes antes da seroconversão (Villa et al. 2019), ou pela produção insuficiente de anticorpos, abaixo do limiar de deteção do teste serológico, condicionada por diversos fatores imunossupressores. Apesar de ser possível que 1 a 3% dos animais seronegativos manifestem sinais de esclerodermia (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a), está descrito que a resposta imunitária desenvolvida é prolongada (8 anos) (Ferreira 1985), e que anticorpos contra *B. besnoiti* persistem em circulação por longos períodos (~210 dias) (Álvarez-García et al. 2013).

É relevante salientar que a maioria dos animais infetados evidenciaram um quadro subclínico, ou seja, não foram observados quaisquer sinais clínicos ou lesões macroscópicas detetáveis nestes bovinos. Este quadro clínico representa a maior proporção de animais infetados em áreas endémicas. No entanto, neste cenário epidemiológico, frequentemente a presença do parasita numa manada só é detetada quando aparecem os primeiros casos clínicos crónicos com infecções cutâneas sistémicas, que representam apenas a “ponta do iceberg” da besnoitiose bovina, isto é, a menor proporção de animais infetados. Nesta ocasião a prevalência no efetivo pode na realidade ser bastante elevada (Liénard et al. 2011).

7.3. Avaliação dos dados do contraste leiteiro e reprodutivos

No que diz respeito ao impacto da infecção por *B. besnoiti* na eficiência da produção leiteira, a análise estatística evidenciou que a seropositividade e a presença de quistos escleroconjuntivais estavam significativamente associadas ao aumento da contagem de células somáticas presentes no leite (Tabelas 24 e 25). Estes resultados poderiam estar relacionados com a excreção do parasita no leite, à semelhança de outros agentes patogénicos (exemplo: *Coxiella burnetii*) (Barlow et al. 2008), contudo, esta hipótese foi descartada, pois a ausência de DNA de *B. besnoiti* no colostro de vacas infetadas foi comprovada por Hornok et al. (2015). As células somáticas presentes no leite incluem células

epiteliais produtoras de leite e leucócitos (principalmente neutrófilos e macrófagos) e a sua presença está associada a infeções da glândula mamária. A imunossupressão, causada pelo BEN, hormonas imunossupressoras associadas ao periparto (progesterona e glucocorticoides) e hipocalcémia, favorece a colonização da glândula mamária por agentes infecciosos, responsável pelo fluxo de neutrófilos para a glândula mamária (Burvenich et al. 2003). A infeção por *B. besnoiti* constitui também um fator imunossupressor e a debilidade causada pela doença contribui para a diminuição das funções imunitárias, existindo a possibilidade de aumentar a suscetibilidade para infeções secundárias na glândula mamária, o que pode justificar o aumento de células somáticas no leite. As infeções da glândula mamária e as mamites causam elevados prejuízos económicos, uma vez que são uma das principais causas de refugo e a principal razão para o uso de antibióticos em vacas leiteiras (Kuipers et al. 2016). O tratamento de mamites é dispendioso e não permite o aproveitamento do leite para consumo devido ao intervalo de segurança dos fármacos utilizados. Para além disso, os produtores podem ainda ser penalizados no preço do litro de leite pela quantidade de células somáticas presentes no leite que entregam mensalmente às empresas.

Verificou-se que os animais com presença de quistos apresentaram variações na produção média diária entre Julho e Março significativamente maiores (Tabela 13), sugerindo a necessidade de mais investigações no âmbito da dinâmica da infeção na produção leiteira.

Foi sugerido que a infeção por *B. besnoiti* pode ser responsável pela diminuição da produção de leite (Cortes et al. 2014), contudo, apenas foi realizado um único estudo no âmbito da avaliação da eficiência produtiva numa exploração leiteira infetada, cuja análise estatística não evidenciou qualquer efeito da seropositividade ou da presença de sinais clínicos nos parâmetros reprodutivos e produtivos em vacas, no entanto, verificou-se uma ligeira diminuição na produção diária, produção estimada aos 305 dias, teor de gordura e teor de proteína nos animais com quistos teciduais (Villa et al. 2019); este efeito não se verifica no presente trabalho, à exceção do teor de proteína (Tabela 8). Em linha com isto, foi descrito pelo produtor que no período pós-parto os animais geralmente apresentam uma queda da produção e que as alterações cutâneas surgem algumas semanas mais tarde. Alguns destes animais recuperaram parcialmente e a produção leiteira retorna aos valores normais. Esta informação encontra-se de acordo com estudos anteriores (Frey et al. 2013; Ryan et al 2016).

Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, averiguou-se que os animais com lesões cutâneas evidentes produziram menos 605 litros aos 305 dias (Tabela 17). No entanto, de acordo com a descrição estatística dos parâmetros da produção leiteira (Tabela 8), a média da produção diária e a produção estimada aos 305 dias aparentam ser ligeiramente mais elevadas no grupo dos animais seropositivos (incluindo bovinos assintomáticos), podendo ser colocada a hipótese de, inicialmente, os animais com produções mais elevadas serem mais suscetíveis à infeção. Assim, apesar de serem necessárias mais investigações e mesmo na

falta de evidências estatísticas, tanto neste trabalho como no estudo realizado por Villa et al. (2019), é razoável considerar que a diminuição da produtividade pode estar correlacionada com a imunossupressão e debilidade causada pela fase crônica da doença. Esta hipótese pode ser sustentada com a presença de infecções secundárias (exemplo: *Demodex bovis*), cujos sinais tornam-se evidentes principalmente em bovinos sujeitos a diversos fatores imunossupressores. No presente estudo, observaram-se lesões nodulares com alguns centímetros de diâmetro (Figura 20) em quatro animais, semelhantes às observadas por Villa et al. (2020) (Anexo 3), contudo, não houve a oportunidade de fazer biópsia ou raspagem das lesões. Apenas duas destas vacas testaram positivo, porém, o soro destes animais foi obtido 3 meses antes da realização do exame clínico, pelo que o seu estado serológico durante a observação clínica era desconhecido.

Na eficiência reprodutiva, o intervalo entre partos demonstrou ser significativamente menor nos animais com lesões cutâneas crônicas (Tabela 33), no entanto, estes resultados foram baseados nos dados de um número reduzido de animais (n=10) (Tabela 30).

No intervalo entre Janeiro de 2020 e Fevereiro de 2021, foram registadas 38 metrites, 14 retenções placentárias e 5 abortos, não se verificando nenhuma associação estatística significativa com o estado serológico dos animais ou com a presença de sinais clínicos. A hipertermia presente na fase aguda da infecção por *B. besnoiti* pode ser uma causa de aborto, no entanto, o impacto da besnoitiose bovina na fertilidade das vacas necessita de ser elucidado, uma vez que já foi relatada a presença do parasita no trato reprodutivo das fêmeas (Frey et al. 2013). Relativamente às vacas que abortaram, três apresentaram um resultado serológico positivo e duas eram seronegativas, embora um dos animais apresentasse positividade para a diluição de 1:125 na prova de IFAT. Esta observação parece sustentar a presença de outras coccídias formadoras de quistos na exploração, nomeadamente *Neospora caninum*, que representa uma importante causa de aborto e de diminuição da fertilidade. A presença de outros agentes patogénicos e outras causas responsáveis por aborto ou patologia reprodutiva deve ser considerada.

7.4. Sugestões para medidas de controlo

Atualmente não existe nenhuma vacina ou tratamento eficaz, assim, o controlo da besnoitiose em efetivos infetados endemicamente deve incidir em medidas de biocontenção, no reforço da biossegurança da exploração e no refugo seletivo com o objetivo de diminuir gradualmente a prevalência, mantendo uma relação de custo-benefício.

Relativamente à exploração do estudo, a elevada seroprevalência com a presença de poucos casos clínicos sugere que o efetivo encontra-se endemicamente infetado há algum tempo, o que torna o controlo da doença mais complexo e desafiante.

Embora não muito prático em explorações leiteiras, uma das alternativas consiste na separação física entre os animais infetados e os bovinos saudáveis, numa distância mínima de vinte metros (Gollnick et al. 2015), após uma testagem serológica. Para este efeito, para cada grupo, seria necessário pelo menos um parque para vacas secas, uma maternidade, um parque para animais em fase pós-parto e parques para vacas em lactação; isto implicaria uma reorganização das infraestruturas e um investimento financeiro considerável. Na ordenha, seria recomendado que os grupos fossem ordenhados separadamente.

Para reduzir a incidência de *B. besnoiti*, é fundamental eliminar os fatores de risco tais como a partilha utensílios, nomeadamente agulhas, que poderão ser desinfetadas entre utilizações ou substituídas por agulhas descartáveis e trocadas entre animais.

Nesta exploração leiteira, é aconselhável a testagem serológica do touro presente na exploração; caso tenha adquirido a infeção, este animal deve ser substituído por um macho não infetado, uma vez que, nesta exploração, apenas as fêmeas do grupo com menor percentagem de animais infetados, ou seja, as novilhas, são sujeitas ao acasalamento natural; o animal adquirido seria destinado à cobrição de novilhas não infetadas. Existe também vantagem em avaliar periodicamente a qualidade do sêmen através de exames andrológicos, uma vez que a besnoitiose bovina está associada a grandes perdas económicas relacionadas com a diminuição da fertilidade dos machos. No entanto, é mais eficiente optar somente pela IA em explorações leiteiras.

É ainda importante salientar que não existe nenhuma limitação no comércio de animais com besnoitiose bovina em Portugal e na Europa, à exceção da Suíça, onde é uma doença de declaração obrigatória (Villa et al. 2019). Porém, a transmissão do parasita entre explorações deve ser evitada dado o impacto económico da doença. Assim, é recomendado um despiste serológico a qualquer animal que entre no efetivo ou seja vendido para outras explorações. No entanto, como verificado neste estudo, um resultado serológico negativo não garante a ausência da infeção por *B. besnoiti*, uma vez que a deteção de anticorpos depende do tempo decorrido entre a infeção e a seroconversão, da competência do sistema imunitário do hospedeiro e da própria sensibilidade do método de diagnóstico utilizado. Idealmente, a vigilância da besnoitiose bovina deve ser baseada num diagnóstico padronizado, combinando diversos métodos de diagnóstico laboratoriais e um exame clínico.

O controlo de vetores e de pragas é essencial e necessita ser reforçado. A limpeza dos parques deve ser efetuada regularmente de forma a não acumular dejetos, que atraem insetos, e eventuais oocistos que possam ser excretados por outras espécies presentes na exploração (Talafha et al. 2015). O acesso dos gatos domésticos e de animais silváticos à exploração deve ser interdito, pois existe a possibilidade de atuarem no ciclo biológico de *B. besnoiti*, para além de serem uma fonte de transmissão de outros agentes patogénicos para os bovinos. Assim, poderá ser necessário limitar fisicamente a área destinada à exploração.

Para reduzir a prevalência, a exploração deve optar por um refugo seletivo. Dado a elevada prevalência, numa fase inicial é recomendado refugar os animais com sinais clínicos ou com baixos índices produtivos. Poderia ser ainda interessante detetar as vacas que mais contribuem para a infeção através da quantificação de DNA, por RT-PCR, em biópsias cutâneas na base da cauda (Grisez et al. 2020), no entanto, isto implicaria um investimento logístico considerável. Numa fase mais avançada do plano de controlo, todos os animais seropositivos deveriam ser também refugados. Porém, o facto de os animais apresentarem infeções subclínicas ou de terem recuperado clinicamente desencoraja os produtores a eliminá-los do efetivo, apesar de constituírem uma fonte de infeção (Gutiérrez-Expósito et al. 2017a). De acordo com a informação comunicada pelo produtor, nesta exploração não está a ser realizada qualquer estratégia de refugo relacionada com a doença.

7.5. Limitações do estudo e investigações futuras

A primeira limitação do estudo está relacionada com o facto das colheitas das amostras dos animais terem sido realizadas em momentos diferentes. Apesar da data da colheita das amostras não ter influenciado estatisticamente os resultados de IFAT (Anexo 8), está descrito que os títulos de anticorpos podem sofrer flutuações dependendo da reexposição do sistema imunitário ao antigénio, ou pela rutura de quistos (Frey et al. 2013), ou através de vetores. Dado que os vetores são mais abundantes no verão, os títulos de anticorpos são mais elevados nessa época (Liénard et al. 2011). De facto, aquando a visualização das lâminas de IFAT, verificou-se uma maior percentagem de resultados positivos com fluorescência mais acentuada nos soros do mês de Outubro, embora esta interpretação seja subjetiva (Tabela 2). Para além disso, a colheita de grande parte dos animais foi efetuada vários meses antes do dia do exame clínico, pelo que existe a possibilidade de terem ocorrido novas infeções. De forma a contornar esta limitação, idealmente as amostras para serologia poderiam ser recolhidas em datas próximas, por exemplo, durante uma ação de saneamento, de forma a não interferir com a rotina da exploração. A realização de um estudo longitudinal durante um intervalo considerável seria também interessante, não só para investigar a dinâmica da infeção e o seu efeito na produtividade, como também procurar esclarecer a relevância de outras vias de transmissão, através do contacto próximo entre bovinos ou mesmo por um ciclo biológico com intervenção de vários hospedeiros (exemplo: gatos domésticos).

O número reduzido de animais infetados com um quadro clínico crónico representa também outra limitação, pois pode ter influenciado os resultados estatísticos. Assim, são necessários mais estudos para determinar o impacto da besnoitiose bovina na produtividade em explorações leiteiras.

Com a finalidade de determinar o efeito da infecção por *B. besnoiti* nas funções imunitárias, teria alguma utilidade determinar a influência da seropositividade ou da presença de sinais clínicos na presença de doenças infecciosas, tais como mastites e metrites.

A origem da infecção na exploração não é clara, pelo que deveria ser investigada, não só para conhecer a situação epidemiológica da região, como elucidar outras formas de transmissão e fatores de risco. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os animais provenientes de explorações exteriores apresentaram menor seroprevalência, sugerindo que a origem do foco está relacionada com a exploração estudada e com a região em causa, que é endémica (Waap et al. 2014). Este cenário epidemiológico é frequente numa região ou exploração quando existe a presença regional do HD, presença e abundância de hospedeiros reservatórios ou atividade de vetores abundante (Álvarez-García et al. 2013).

Os reservatórios de *B. besnoiti* incluem bovinos subclínicamente infetados e ruminantes silváticos, nomeadamente cervídeos, cuja transmissão pode ocorrer por contacto direto ou por vetores mecânicos. Existe a possibilidade dos bovinos de carne que tiveram acesso aos pastos da exploração constituírem um dos reservatórios da doença e de estarem relacionados com a introdução do parasita no efetivo. Para esclarecer esta hipótese, seria necessário submeter os animais das explorações vizinhas a um exame serológico. Para além disso, os vetores da doença possuem um comportamento alimentar oportunista, o que pode criar uma ponte na transmissão do parasita entre espécies domésticas e silváticas (Álvarez-García et al. 2013). Neste sentido, para além de serem necessários mais estudos entomológicos, a relevância dos ruminantes selvagens da região no ciclo biológico do parasita poderia ser investigada através de estudos epidemiológicos com recurso a serologia.

O HD de *B. besnoiti* permanece desconhecido, assim, a sua presença na região não deve ser descartada. Está descrito que, em Portugal, os cadáveres de bovinos são rapidamente recolhidos, não ficando acessíveis a animais carnívoros (Cortes et al. 2014), no entanto, estes podem ficar na exploração por tempo suficiente para que potenciais hospedeiros ingiram os tecidos infetados. Assim, recomenda-se a investigação do papel de espécies domésticas e silváticas que tenham acesso à exploração, particularmente gatos e raposas, através da realização de um rastreio serológico e pesquisa de oocistos ou de DNA de *B. besnoiti* em amostras de fezes ou mesmo no ambiente.

8. Conclusão

O estudo relata infeções e casos clínicos de besnoitiose em bovinos leiteiros em Portugal, fazendo uma caracterização serológica e clínica da exploração. Os animais com mais de um ano de idade foram submetidos a uma testagem serológica por IFAT e a uma inspeção clínica para pesquisa de sintomas de besnoitiose bovina. A prevalência real foi de 61,6% e cerca de 8% dos animais apresentava um quadro clínico crónico. A elevada prevalência serológica e a baixa prevalência clínica enquadram o efetivo num cenário endémico, sendo ainda indicativo que a doença encontra-se em expansão no Alentejo. Na Europa, o número de explorações leiteiras infetadas parece estar a aumentar, no entanto, o impacto económico da doença na performance produtiva permanece indeterminado.

Este estudo revela que a besnoitiose bovina pode ter um impacto económico considerável na produção leiteira, uma vez que a análise estatística evidenciou a associação da infeção por *B. besnoiti* com um aumento da contagem células somáticas. A debilidade causada pela doença é um fator imunossupressor que contribui para a diminuição das funções imunitárias, aumentando a suscetibilidade dos animais para infeções secundárias, por exemplo, na glândula mamária, responsáveis por elevados prejuízos económicos.

Os animais com presença de quistos escleroconjuntivais apresentaram maiores variações na produção média diária entre Julho de 2020 e Março de 2021. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, averiguou-se que os animais com lesões cutâneas evidentes produziram menos leite aos 305 dias, o que pode estar correlacionado com a debilidade causada pela fase crónica da doença. Assim, são necessárias mais investigações para determinar a dimensão do impacto da doença na produção leiteira e reprodução, assim como compreender a dinâmica da infeção e a sua influência nestes parâmetros.

A besnoitiose bovina, apesar de ser uma doença parasitária negligenciada, tem um grande impacto económico. A implementação de um plano de vigilância e controlo é complexa e deve estar adaptada ao cenário epidemiológico de cada exploração ou região. Os produtores e médicos-veterinários devem estar cientes das consequências da doença na saúde e bem-estar dos animais, sensibilizados para os prejuízos causados e informados sobre aspetos clínicos e biológicos da besnoitiose bovina. As medidas de biossegurança devem ser reforçadas e a vigilância deve ser realizada com base num conjunto de métodos de diagnóstico laboratoriais e clínicos, sobretudo em áreas endémicas e de reemergência.

A investigação relacionada com a epidemiologia, diagnóstico, tratamento, assim como aspetos relativos à dinâmica da infeção, ciclo biológico e relevância das diversas vias de transmissão são fundamentais, não só para a implementação de um plano de prevenção e controlo mais eficiente da besnoitiose bovina, como também para apoiar o setor pecuário, permitindo um aumento da eficiência da produção de recursos alimentares, uma minimização dos prejuízos económicos e também uma melhor saúde e bem-estar animal.

9. Referências bibliográficas

- Alshehabat M, Alekish M, Talafha A. 2016. Selected metabolic biochemical and enzyme activities associated with *Besnoitia besnoiti* infection in dairy cattle. *Trop Anim Health Prod.* 48(6):1301-1304. doi:10.1007/s11250-016-1077-7
- Álvarez-García G, Fernández-García A, Gutiérrez-Expósito D, Quiteria JARS, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora LM. 2014a. Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe. *Vet J.* 200(2):328-331. doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.013
- Álvarez-García G, Frey CF, Mora LMO, Schares G. 2013. A century of bovine besnoitiosis: An unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol.* 29(8):407-415. doi:10.1016/j.pt.2013.06.002
- Álvarez-García G, García-Lunar P, Gutiérrez-Expósito D, Shkap V, Ortega-Mora LM. 2014b. Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology.* 141(11):1419-1435. doi:10.1017/S0031182014000729
- Arnal MC, Gutiérrez-Expósito D, Martínez-Durán D, Regidor-Cerrillo J, Revilla M, Fernández de Luco D, Jiménez-Meléndez A, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2017. Systemic Besnoitiosis in a Juvenile Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *Transbound Emerg Dis.* 64(5):e8-e14. doi:10.1111/tbed.12514
- Barlow J, Rauch B, Welcome F, Kim SG, Dubovi E, Schukken Y. 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 39:23. doi:10.1051/vetres:2007060
- Basso W, Schares G, Gollnick NS, Rütten M, Deplazes P. 2011. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti*-Experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Vet Parasitol.* 178(3-4):223-234. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.027
- Basson PA, McCully RM, Bigalke RD. 1970. Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *Onderstepoort J Vet Res.* 37(2):105-126.
- Bigalke RD. 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort J Vet Res.* 35(1):3-137.
- Bigalke RD. 1981. Besnoitiosis and Globidiosis. In: *Diseases of Cattle in the Tropics*. Vol 6. p 429-440 [place unknow]: Springer Science+Business Media Dordrecht doi: 10.1007/978-94-015-6895-1
- Bigalke RD, Schoeman JH, McCully RM. 1974. Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. *Onderstepoort J Vet Res.* 41(1):1-5.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res.* 34 (1): 521–564. doi:10.1051/vetres:2003023
- Cervantes-Valencia ME, Hermosilla C, Alcalá-Canto Y, Tapia G, Taubert A, Silva LMR. 2019. Antiparasitic efficacy of curcumin against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites in vitro. *Front Vet Sci.* 5(JAN). doi:10.3389/fvets.2018.00333

Chatikobo P, Choga T, Ncube C, Mutambara J, 2013. Participatory diagnosis and prioritization of constraints to cattle production in some smallholder farming areas of Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.* 109, 327–333.

Cortes H, Chagas e Silva J, Baptista MC, et al. 2006a. *Besnoitia besnoiti* impact on fertility of cattle exploited in Mediterranean pastures (Alentejo). *Anim Prod from Mediterr area.* (119):323-329.

Cortes H, Ferreira ML, Silva JF, Vidal R, Caeiro PS V. 2003. Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal Contribution to the knowledge of bovine besnoitiosis in Portugal. *Medicina (B Aires).* 98:43-46.

Cortes H, Leitão A, Gottstein B, Hemphill A. 2014. A review on bovine besnoitiosis: A disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology.* 141(11):1406-1417. doi:10.1017/S0031182014000262

Cortes H, Leitão A, Vidal R, et al. 2005. Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Vet Rec.*157(9):262-264. doi:10.1136/vr.157.9.262

Cortes H, Muller N, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. 2011. In vitro effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology.*138(5):583-592. doi:10.1017/S0031182011000114

Cortes H, Nunes S, Reis Y, Staubli D, Vidal R, Sager H, Leitão A, Gottstein B. 2006b. Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Vet Parasitol.*141(3-4):216-225. doi:10.1016/j.vetpar.2006.05.023

Cortes H, Reis Y, Gottstein B, Hemphill A, Leitão A, Müller N. 2007a. Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet Parasitol.* 146(3-4):352-356.

Cortes HC, Mueller N, Esposito M, Leitão A, Naguleswaran A ,Hemphill A. 2007b. In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology.* 134: 975-985.

Cortes H, Reis Y, Waap H, Vidal R, Soares H, Marques I, Pereira da Fonseca I, Fazendeiro I, Ferreira ML, Caeiro V, et al. 2006c. Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet Parasitol.*;141(3-4):226-233. doi:10.1016/j.vetpar.2006.05.022

Dempster RP. 1984. *Toxoplasma Gondii*: Purification of Zoites from Peritoneal Exudates by Eight Methods. *Experimental Parasitology*, vol. 57 (2): 195–207. doi:10.1016/0014-4894(84)90080-8.

Diesing L, Heydorn AO, Matuschka FR, Bauer C, Pipano E, De Waal DT, Potgieter FT. 1988. *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitology Research*, 75, 114-117.

Diezma-Díaz C. 2019. Desarrollo de un modelo bovino de infección experimental por *Besnoitia besnoiti* [dissertation]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid - Facultad de Veterinaria

Diezma-Díaz C, Ferre I, Re M, Jiménez-Meléndez A, Tabanera E, González-Huecas M, Pizarro-Díaz M, Yanguas-Pérez D, Brum PL, Blanco-Murcia J, et al. 2019 The route of *Besnoitia besnoiti* tachyzoites inoculation does not influence the clinical outcome of the infection in calves. *Vet Parasitol.* 267(October 2018):21-25. doi:10.1016/j.vetpar.2019.02.001

- Diezma-Díaz C, Ferre I, Saldías B, Blanco-Murcia J, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2020. Added value of IgM detection and low avidity index as markers of acute bovine besnoitiosis. *Vet Parasitol.* 277(August 2019):109012. doi:10.1016/j.vetpar.2019.109012
- Diezma-Díaz C, Jiménez-Meléndez A, Fernández M, Gutiérrez-Expósito D, García-Lunar P, Ortega-Mora LM, Pérez-Salas JA, Blanco-Murcia J, Ferre I, Álvarez-García G. 2017. Bovine chronic besnoitiosis in a calf: Characterization of a novel *B. besnoiti* isolate from an unusual case report. *Vet Parasitol.* 247(July):10-18. doi:10.1016/j.vetpar.2017.09.017
- Diezma-Díaz C, Jiménez-Meléndez A, Re MT, Ferre I, Ferreras MC, Gutiérrez-Expósito D, Rojo-Montejo S, Román-Trufero A, Benavides-Silván J, García-Lunar P, et al. 2018. Effect of parasite dose and host age on the infection with *Besnoitia besnoiti* tachyzoites in cattle. *Transbound Emerg Dis.* 65(6):1979-1990. doi:10.1111/tbed.12980
- Dubey JP, Lindsay DS. 2003. Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites. *Int J Parasitol.* 33(8):807-819. doi:10.1016/S0020-7519(03)00087-0
- Dubey JP, Van Wilpe E, Blignaut DJ, Schares G, Williams JH. 2013. Development of early tissue cysts and associated pathology of *Besnoitia besnoiti* in a naturally infected bull (*Bos taurus*) from South Africa. *J. Parasitol.* 99 (3): 459-466. doi:10.1645/12-128.1
- Dubey JP, Yabsley MJ. 2010. *Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*). *Parasitology.* 137(12):1731-1747. doi:10.1017/S0031182010000636
- Eberhard N, Balmer V, Müller J, Müller N, Winter R, Pou S, Nilsen A, Riscoe M, Francisco S, Leitao A, et al. 2020. Activities of Endochin-Like Quinolones Against in vitro Cultured *Besnoitia besnoiti* Tachyzoites. *Front Vet Sci.* 7(February):1-13. doi:10.3389/fvets.2020.00096
- EFSA. 2010. Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 8, 1499-1514. doi:10.2903/j.efsa.2010.1499
- Ellis JT, Holmdahl OJM, Ryce C, Njenga JM, Harper PAW, Morrison DA. 2000. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist.* 151(4):329-336. doi:10.1078/S1434-4610(04)70031-0
- Esteban-Gil A, Calvete C, Casasús I, Sanz A, Ferrer J, Peris MP, Marcén-Seral JM, Castillo JA. 2017. Epidemiological patterns of bovine besnoitiosis in an endemic beef cattle herd reared under extensive conditions. *Vet Parasitol.* 236:14-21. doi:10.1016/j.vetpar.2016.12.018
- Fernández-García A, Álvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM. 2009. Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Vet Parasitol.* 164(2-4):104-110. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.020
- Ferreira ML. 1985. *Besnoitiose Bovina. Aspectos Anátomo- Clínicos.* Tipografia Minerva Central: Maputo, R.P. Moçambique.
- Frey CF, Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, Benavides J, Marcén JM, Castillo JA, Casasús I, Sanz A, García-Lunar P, Esteban-Gil A, et al. 2013. Chronic bovine besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Vet Parasitol.* 197(1-2):95-103. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.023

García-Lunar P, Ortega-Mora LM, Schares G, Diezma-Díaza C, Álvarez-García G. 2017. A new lyophilized tachyzoite based ELISA to diagnose *Besnoitia* spp. infection in bovids and wild ruminants improves specificity. *Vet Parasitol.* 244: 176-182.

Garrido-Castañé I, Romero AO, Espuny JC, Hentrich B, Basso W. 2019. *Besnoitia besnoiti* seroprevalence in beef, dairy and bullfighting cattle in Catalonia (north-eastern Spain): A cross-sectional study. *Parasitol Int.* 69(October 2018):71-74. doi:10.1016/j.parint.2018.12.001

Gentile A, Militerno G, Schares G, et al, Nanni A, Testoni S, Bassi P, and Gollnick N. 2011. Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy-First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Vet Parasitol.* 184(2-4):108-115. doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.014

Gollnick NS, Scharr JC, Schares G, Langenmayer MC. 2015. Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: Chronology of disease progression. *BMC Vet Res.* 11(1):1-16.

González-Barrio D, Köster PC, Habela M, Martín-Pérez M, Fernández-García J, Balseiro A, Barrel M, Najera F, Figueiredo A, Palacios MJ, et al. Molecular survey of *Besnoitia* spp. (Apicomplexa) in faeces from European wild mesocarnivores in Spain. *Authorea.* (February 2021): 1-9. doi: 10.22541/au.161390091.19555349/v1

Grisez C, Bottari L, Prévot F, Alzieu JP, Liénard E, Corbière F, Rameil M, Desclaux X, Lacz C, Boulon C, et al. 2020. Real-time PCR on skin biopsies for super-spreaders' detection in bovine besnoitiosis. *Parasites and Vectors.* 13(1):1-11. doi:10.1186/s13071-020-04405-7

Gutiérrez-Expósito D, Arnal MC, Martínez-Durán D, Regidor-Cerrillo J, Revilla M, Fernández de Luco DL, Jiménez-Meléndez A, Calero-Bernal R, Habela MA, García-Bocanegra I, et al. 2016a. The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Vet Parasitol.* 223:7-13. doi:10.1016/j.vetpar.2016.04.005

Gutiérrez-Expósito D, Ferre I, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2017a. Advances in the diagnosis of bovine besnoitiosis: current options and applications for control. *Int J Parasitol.* 47(12):737-751. 116(1):445-448. doi:10.1016/j.ijpara.2017.08.003

Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, Ara V, Marco I, Lavín S, Carvajal-Valilla J, Morales A, Álvarez-García G. 2016b. Absence of antibodies specific to *Besnoitia* spp. in European sheep and goats from areas in Spain where bovine besnoitiosis is endemic. *Parasitol Res.* doi: 10.1007/s00436-016-5311-z

Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, García-Lunar P, Rojo-Montejo S, Zabala J, Serrano M, Álvarez-García G. 2017b. Clinical and Serological Dynamics of *Besnoitia besnoiti* Infection in Three Endemically Infected Beef Cattle Herds. *Transbound Emerg Dis.* 64(2):538-546. doi:10.1111/tbed.12402

Habarugira G, Nkuranga C, Asimwe B, Turikumwenayo JB, Ojok L. 2019. First confirmed case of bovine besnoitiosis in Rwanda. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 17(January 2018):100294. doi:10.1016/j.vprsr.2019.100294

Hornok S, Fedák A, Baska F, et al. 2015. Vector-borne transmission of *Besnoitia besnoiti* by blood-sucking and secretophagous flies: Epidemiological and clinicopathological implications. *Parasites and Vectors.* 8(1):4-9. doi:10.1186/s13071-015-1058-0

Jacquet P, Liénard E, Franc M, Basso W, Dencso L, Tóth G, Szeredi L, Abonyi T, Dénes B. 2010. Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Vet Parasitol.* 174(1-2):30-36. doi:10.1016/j.vetpar.2010.08.013

- Jiménez-Meléndez A, Ojo KK, Wallace AM, Smith TR, Hemphill A, Balmer V, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Hehl AB, Fan E, et al. 2017. In vitro efficacy of bumped kinase inhibitors against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 47(12):811-821. doi:10.1016/j.ijpara.2017.08.005
- Jiménez-Meléndez A, Rico-San Román L, Hemphill A, Balmer V, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2018. Repurposing of commercially available anti-coccidials identifies diclazuril and decoquinate as potential therapeutic candidates against *Besnoitia besnoiti* infection. *Vet Parasitol.* 261:77-85. doi:10.1016/j.vetpar.2018.08.015
- Kumi-Diaka J, Wilson S, Sanusi A, Njoku CE, Osori DI. 1981. Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. *Theriogenology.* 16(5): 523-530.
- Kuipers A, et al. 2016 Antibiotic Use in Dairy Herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, vol. 99 (2): 1632–48. doi:10.3168/jds.2014-8428.
- Langenmayer MC, Gollnick NS, Majzoub-Altweck M, Scharr JC, Schares G, Hermanns W. 2015. Naturally Acquired Bovine Besnoitiosis: Histological and Immunohistochemical Findings in Acute, Subacute, and Chronic Disease. *Vet Pathol.* 52(3):476-488.
- Liénard E, Salem A, Grisez C, Prévot F, Bergeaud JP, Franc M, Gotstein B, Alzieu JP, Lagalisse Y, Jacquet P. 2011. A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Vet Parasitol.* 177(1-2):20-27. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.030
- Mazuz ML, Alvarez-García G, King R, Savisky I, Shkap V, Ortega-Mora LM, Gutiérrez-Expósito D. 2018. Exposure to *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. in wildlife from Israel. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 7(3):317-321. doi:10.1016/j.ijppaw.2018.08.002
- McCully RM, Basson PA, Niekerk J, Bigalke RD. 1966. Observations on *Besnoitia* cysts in the cardio-vascular system of some wild antelopes and domestic cattle. *Onderstepoort J Vet Res.* 33(February):245-276. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/57882>
- Müller J, Manser V, Hemphill A. 2019. In vitro treatment of *Besnoitia besnoiti* with the naphthoquinone buparvaquone results in marked inhibition of tachyzoite proliferation, mitochondrial alterations and rapid adaptation of tachyzoites to increased drug concentrations. *Parasitology.* 146(1):112-120. doi:10.1017/S0031182018000975
- Olias P, Schade B, Mehlhorn H. 2011. Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infect Genet Evol.* 11(7):1564-1576. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.006
- Pols JW. 1960. Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort J Vet Res.* 25(3):37-44.
- Ryan EG, Lee A, Carty C, O'Shaughnessy J, Kelly P, Cassidy JP, Sheehan M, Johnson A, De Waal T. 2016. Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. *Vet Rec.* 178(24):608. doi:10.1136/vr.103683
- Schares G, Basso W, Majzoub M, Cortes H, Rostaher A, Selmair J, Hermanns W, Conraths F, Gollnick N. 2009. First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet Parasitol.* 163(4):315-322. doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.033

- Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr SC, Langenmayer MC, Selmair J, Dubey JP, Cortes HC, Conraths FJ, et al. 2010. Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Vet Parasitol.* 171(1-2):32-40. doi:10.1016/j.vetpar.2010.03.017
- Schares G, Langenmayer MC, Majzoub-Altweck M, Scharr JC, Gentile A, Maksimov A, Schares S, Conraths FJ, Gollnick NS. 2016. Naturally acquired bovine besnoitiosis: Differential distribution of parasites in the skin of chronically infected cattle. *Vet. Parasitol.* 216: 101-107. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.12.016
- Schares G, Langenmayer MC, Scharr JC, Minke L, Maksimov P, Maksimov A, Schares S, Bärwald A, Basso W, Dubey et al. 2013. Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int J Parasitol.* 43(2):143-154. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.011
- Schares G, Nascimento D, Bärwald A, Jutras C, Rivard S, Brodeur V, DeNotta SA, Basso W, Conraths FJ. 2020. First highly sensitive and specific competitive ELISA for detection of bovine besnoitiosis with potential as a multi-species test. *Int J Parasitol.* 50: 389-401
- Schares G, Schares G, Rachel F, Wachter B. 2021. Molecular Analysis Revealed that Namibian Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) are definitive hosts of a so far undescribed *Besnoitia* species. *Research Square.* (February 2021): 1-9. doi:10.21203/rs.3.rs-235843/v1
- Seltmann A, Schares G, Aschenborn OHK, Heinrich SK, Thalwitzer S, Wachter B, Cziráj G. 2020. Species-specific differences in *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* seroprevalence in Namibian wildlife. *Parasites and Vectors.* 13(1):1-12. doi:10.1186/s13071-019-3871-3
- Sharif S, Jacquet P, Prevot F, Grisez C, Raymond-Letron I, Semin M, Geffré A, Trumel C, Franc M, Boushira É, Liénard E. 2019. *Stomoxys calcitrans*, mechanical vector of virulent *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle to susceptible rabbit. *Medical and Veterinary Entomology.* 33(2): 247-255. doi: 10.1111/mve.12356
- Shkap V, Pipano E, Marcus S, Krigel Y. 1994. Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort J Vet Res.* 61(3):273-275.
- Shkap V, Pipano E, Ungar-Waron H. 1987. *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro. *Rev d'élevage Med Vet des pays Trop.* 40(3):259-264.
- Shkap V, Reske A, Pipano E, Fish L, Baszler T. 2002. Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol.* 106(1):35-43. doi:10.1016/S0304-4017(02)00030-4
- Shkap V, Ungar-Waron H, Pipano E, Greenblatt C. 1984. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop Anim Health Prod.* 16(4):233-238. doi:10.1007/BF02265330
- Smith DD, Frenkel JK. 1977. *Besnoitia darlingi* (Protozoa: Toxoplasmatinae): cyclic transmission by cats. *Journal of Parasitology.* 63(6):1066-1071. doi: 10.2307/3279847
- Stilwell G. 2013. Clínica de Bovinos. Lisboa: Edição especial para a Bayer. Chapter 3, As doenças mais importantes dos bovinos; p. 153-156.

Talafha AQ, Al-Majali AM, Ababneh MM, Abutarbush SM. 2015. Epidemiologic study on *Besnoitia besnoiti* infection in dairy herds in Jordan. *Parasitol Res.* 114(7):2491-2497. doi:10.1007/s00436-015-4448-5

Verma SK, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, Lavallo MJ, Rosenthal BM, Dubey JP. 2017. Bobcats (*Lynx rufus*) are natural definitive host of *Besnoitia darlingi*. *Vet Parasitol.* 248(October):84-89. doi:10.1016/j.vetpar.2017.10.013

Villa L, Gazzonis AL, Perlotti C, Zanzani SA, Sironi G, Manfredi MT. 2020. First report of *Demodex bovis* infestation in bovine besnoitiosis co-infected dairy cattle in Italy. *Parasitol Int.* 75(May 2019):102021. doi:10.1016/j.parint.2019.102021

Villa L, Gazzonis AL, Zanzani SA, Perlotti C, Sironi G, Manfredi MT. 2019. Bovine besnoitiosis in an endemically infected dairy cattle herd in Italy: serological and clinical observations, risk factors, and effects on reproductive and productive performances. *Parasitol Res.* 118(12):3459-3468. doi:10.1007/s00436-019-06501-9

Waap H. 2015. Epidemiologia e diagnóstico da Besnoitiose bovina em Portugal [dissertation]. Lisboa: Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária.

Waap H, Cardoso R, Marcelino E, Malta J, Cortes H, Leitão A. 2011. A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Vet Parasitol.* 178(3-4):217-222. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.035

Waap H, Nunes T, Cortes H, Leitão A, Vaz Y. 2014. Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitology Research*, 113(10), 3703–3711.

Waap H, Nunes T, Cortes H, Leitão A, Vaz Y. 2015. Percepção da besnoitiose bovina em Portugal - Questionário aos Médicos Veterinários de campo. 110:201-208.

Waap H, Nunes T, Vaz Y, Leitão A. 2016. Serological survey of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti* in a wildlife conservation area in southern Portugal. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 3-4:7-12. doi:10.1016/j.vprsr.2016.05.003

Wallace GD, Frenkel JK. 1975. *Besnoitia* Species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): Recognition of Cyclic Transmission by Cats. *Science.* 188: 369-371.

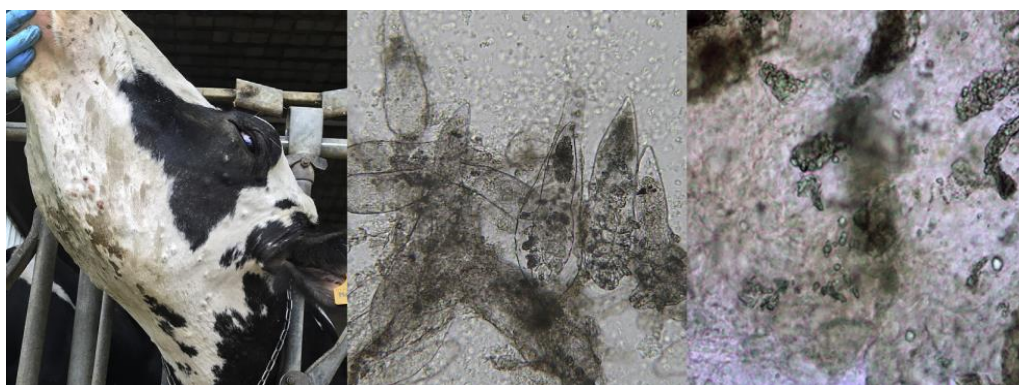
10. Anexos

Anexo 1 – Sequência temporal dos sinais clínicos numa infeção experimental de um bovino (adaptado de Bigalke 1981)

Fase da doença	Sinais clínicos	Dias após a infeção
Aguda	Pirexia	3
	Inapetência	3
	Polipneia	3
	Hiperémia do plano nasal	4
	Aparecimento de endozoitos no sangue	4
	Fraqueza nos membros posteriores	6
	Anasarca	7
	Desaparecimento de endozoitos no sangue	12
	Normotermia	14
	Necrose da pele	21
	Desaparecimento da anasarca	23
Crónica	Alopecia	25
	Esclerodermia	25-35
	Linfoadenomegália	29
	Quistos visíveis na conjuntiva da esclera	36
	Quistos maduros	71

Anexo 2 – Patogenia das lesões cutâneas de besnoitiose (adaptado de Basson et al. 1970)

Fase da doença	Lesões	Dias após a infeção
Aguda	Perivasculite e proliferação vascular	3-4
	Deteção de Besnoitia	6
	Proliferação no endotélio	7-10
	Edema	7
	Trombose	7
	Histiócitos hipertrofiados	8
	Aparecimento precoce de quistos (15-25µm)	11
	Células multinucleadas hipertrofiadas	16
	Desenvolvimento dos quistos	16-25
	Desaparecimento de edemas	25
Subaguda	Quistos jovens (< 100µm)	26
	Quistos com septos	30
	Quistos necróticos	30-77
	Quistos quase maduros (300µm)	70
Crónica	Quistos maduros (> 300µm)	71
	Parede dos quistos avermelhada com HE	385



Anexo 3 – Infeção concomitante com *Demodex bovis* num caso crónico de besnoitiose bovina (adaptado de Villa et al. 2020)

Anexo 4 – Regressão logística: presença de quistos escleroconjuntivais em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    -3.1239     1.0278   -3.039  0.00237 **
Fase2[T.F]       0.3784     0.7252    0.522  0.60187
Fase2[T.N]       1.1660     1.3844    0.842  0.39966
Fase2[T.F]      -0.4613     0.6241   -0.739  0.45989
Fase2[T.PP]      0.1223     0.7769    0.157  0.87486
Fase2[T.S]       0.7771     1.0122    0.768  0.44261
Idade           0.3022     0.1748    1.729  0.08378 .
IFAT[T.positivo] 1.7326     0.5473    3.166  0.00155 **
Origem2[T.Estudo] 0.9625     0.6450    1.492  0.13561
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Anexo 5 – Teste de Qui quadrado: Presença de baixa condição corporal com Idade e resultado da prova de IFAT

```

Frequency table:
      age
BaixaCC 1 2 3 4 5 6 7
ausente 31 56 35 39 16 3 9
presente 0 5 5 2 5 3 3

Column percentages:
      age
BaixaCC 1 2 3 4 5 6 7
ausente 100 91.8 87.5 95 76.2 50 75
presente 0 8.2 12.5 5 23.8 50 25
Total 100 100.0 100.0 100 100.0 100 100
Count 31 61.0 40.0 40 21.0 6 12

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 21.295, df = 6, p-value = 0.001624

Frequency table:
      IFAT
BaixaCC negativo positivo
ausente 89 99
presente 4 19

Column percentages:
      IFAT
BaixaCC negativo positivo
ausente 95.7 83.9
presente 4.3 16.1
Total 100.0 100.0
Count 93.0 118.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 7.4571, df = 1, p-value = 0.006319

```

Anexo 6 – Regressão logística: Presença de baixa condição corporal em função das variáveis idade, origem, fase do ciclo produtivo e resultado da prova de IFAT

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -4.7010     0.9759   -4.817 0.00000146 ***
Idade          0.4292     0.1545    2.777  0.00549 **
Fase2[T.F]     -1.1654     0.8124   -1.435  0.15142
Fase2[T.N]    -15.3018  1369.5951  -0.011  0.99109
Fase2[T.F]     -0.2914     0.7137   -0.408  0.68302
Fase2[T.PP]    -0.6243     0.8374   -0.746  0.45596
Fase2[T.S]      1.4704     0.8636    1.703  0.08864 .
Origem2[T.Estudo] 0.7817     0.6408    1.220  0.22252
IFAT[T.positivo] 0.9809     0.6052    1.621  0.10505
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Anexo 7 – Teste de Qui quadrado: Patologia Reprodutiva com resultado da prova de IFAT e presença de sinais clínicos (quistos e lesões cutâneas)

```

Frequency table:
      IFAT
Patologia negativo positivo
ausente 86 114
presente 17 30

Column percentages:
      IFAT
Patologia negativo positivo
ausente 83.5 79.2
presente 16.5 20.8
Total 100.0 100.0
Count 103.0 144.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 0.7302, df = 1, p-value = 0.3928

Frequency table:
      SCC
Patologia ausente presente
ausente 36 36
presente 14 10

Column percentages:
      SCC
Patologia ausente presente
ausente 72 78.3
presente 28 21.7
Total 100 100.0
Count 50 46.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 0.50087, df = 1, p-value = 0.4791

Frequency table:
      SinaisCutaneos
Patologia Saudavel Doente
ausente 142 14 1
presente 38 2 0

Column percentages:
      SinaisCutaneos
Patologia Saudavel Doente
ausente 78.9 87.5 100
presente 21.1 12.5 0
Total 100.0 100.0 100
Count 180.0 16.0 1

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 0.92941, df = 2, p-value = 0.6283

```

Anexo 8 – Teste de Qui quadrado: Mês da colheita da amostra com resultado da prova de IFAT e presença de sinais clínicos (quistos e lesões cutâneas)

```

Frequency table:
      IFAT
Data.Colheita negativo positivo
Dezembro 7 5
Janeiro 28 24
Novembro 62 82
Outubro 20 34

Column percentages:
      IFAT
Data.Colheita negativo positivo
Dezembro 6.0 3.4
Janeiro 23.9 16.6
Novembro 53.0 56.6
Outubro 17.1 23.4
Total 100.0 100.0
Count 117.0 145.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 4.1029, df = 3, p-value = 0.2506

Frequency table:
      SCC
Data.Colheita ausente presente
Dezembro 5 2
Janeiro 7 4
Novembro 30 28
Outubro 8 12

Column percentages:
      SCC
Data.Colheita ausente presente
Dezembro 10 4.3
Janeiro 14 8.7
Novembro 60 60.9
Outubro 16 26.1
Total 100 100.0
Count 50 46.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 2.8111, df = 3, p-value = 0.4217

Frequency table:
      SinaisCutaneos
Data.Colheita Doente Saudavel
Dezembro 0 0 9
Janeiro 0 2 44
Novembro 0 7 111
Outubro 1 7 31

Column percentages:
      SinaisCutaneos
Data.Colheita Doente Saudavel
Dezembro 0 0.0 4.6
Janeiro 0 12.5 22.6
Novembro 0 43.8 56.9
Outubro 100 43.8 15.9
Total 100 100.1 100.0
Count 1 16.0 195.0

Pearson's Chi-squared test
data: .Table
X-squared = 12.586, df = 6, p-value = 0.05011

```


Anexo 9 – Folha de campo para exame clínico (página 1/6) (fotografia original)

BESNOITIOSE BOVINA: FOLHA DE CAMPO PARA EXAME CLÍNICO															
Alterações dermatológicas								Locomoção		CC	Ln	Corrimento		Quistos	OBS
Face	Pescoço	Peito	Dorso	Tórax	Membros proximal	Membros distal	Ubere	Cascos	Claudação			Nasal	Ocular		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
2	1	1	1	1	1	2	1	0	1	2,5	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
															Vendida
3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	✓	X	X	✓	Morreu
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	Lesão ocular
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	✓	
2	2	1	1	1	1	1	0	2	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
															Vendida
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓?	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2,5	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
															Vendida
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0/1	0	1	0	0	0	0	0	1	3,25	X	X	X	—	Subleptia
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3,5	X	X	X	—	
0	0	0	1	0	0/1	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	Subleptia
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	2,25	X	X	X	—	

Alterações dermatológicas										Locomoção		Corrimento		Quistos	OBS
Face	Pescoço	Peito	Dorso	Tórax	Membros proximal	Membros distal	Ubers	Cascos	Claudicação	CC	Ln	Nasal	Ocular		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2				✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75				—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2,75	X	5	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	M	✓	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
1	1	3	2	1	1	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
1	1	3	2	1	1	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—</	

Anexo 11 – Folha de campo para exame clínico (página 3/6) (fotografia original)

Alterações dermatológicas								Locomoção		CC	Ln	Corrimento		Quistos	OBS
Face	Pescoço	Peito	Dorso	Tórax	Membros proximal	Membros distal	Ubere	Cascos	Claudicação			Nasal	Ocular		
2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	3,25	X	X	X	—	Seborreia
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	X	X	X	—	
1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
1	1	0	0	0	0	0	2	1	2	2,25	X	X	X	✓	Veredelo
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	X	
0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	X	X	X	✓	
1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	M	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
1	0	1	0	0	2	1	1	0	1	2,75	X	X	X	—	Atimacia
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,25	X	X	X	—	Dispnéia
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	X	X	X	✓	Abdução
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	S	X	X	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	

Anexo 12 – Folha de campo para exame clínico (página 4/6) (fotografia original)

Alterações dermatológicas									Locomoção		CC	Ln	Corrimento		Quistos	OBS
Face	Pescoço	Peito	Dorso	Tórax	Membros proximal	Membros distal	Úbere	Casos	Claudicação	Nasal			Ocular			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2,5	X	X	X	—		
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X	Nódulos	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
2	3	2	2	1	3	2	2	1	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	✓		
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	X	X	X	—		
0	1	0	0	1	2	1	2	2	2	3,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	M	✓	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	✓	X		
1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	2	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X		
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	4	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X		
0	0	0	0	0	1	2	1/2	2	3	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	X		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	X	M	X	—	Nódulos	
0	0	0	0	0	0	1/0	1	0	1	3	X		X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,5	X	X	X	X	Nódulos	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	✓		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,75	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	X	X	X	—		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	X	X	X	X		

Alterações dermatológicas (0-3): 0- Sem alterações; 1- Irregularidade e liquenificação ligeiras; 2- Irregularidades e lesões moderadas; 3- Espessamento e alopecia
 Alterações dermatológicas úbere (0-3): 0- Sem alterações; 1- Lesões de dermatite ligeiras; 2- Irregularidades e lesões moderadas; 3- Quistos intradérmicos e crostas
 Claudicação (1-5) e Condição corporal (CC) (1-5): Anexo
 Corrimento: S-seroso; M-mucoso; P-purulento

[illegible]

Anexo 14 – Folha de campo para exame clínico (página 6/6) (fotografia original)

Figura 1: Lesões de besnoitiose (Goldnik et al. 2015)



Figure 1 The chronic stage of bovine besnoitiosis. Clinical findings in study animal 20. Reference to the day when the picture was taken is provided in the figure title (days post inoculation). **A)** Parasitic cysts in the scleral conjunctiva were very difficult to detect in the early stage of chronic disease. Only reflections of light where scleral conjunctiva is slightly uneven can be appreciated. A few reflections are indicated (1-4). **B)** Less than two weeks later, pale, almost translucent cysts were easily noticeable. A few cysts are indicated by the arrow (1-4). **C)** At the end of the following period cysts were pearl white with an apparent diameter of up to 1 mm. **D)** Clinically unaffected skin of left front leg. **E)** Papular eruptions and open skin lesion on left front leg few weeks later. **F)** Irregular brown and encrusted epidermal areas on left front leg. **G)** Clinically unaffected skin of left hind leg. **H)** Skin on left hind leg uneven and slightly thickened. **I)** Thickened and hyperkeratotic skin on left front leg. **J)** Parasitic cysts in the vestibulum region were of similar size and color as those in the scleral conjunctiva near the end of the follow up period. A few cysts are indicated (1-4). **K)** Cyst of right hind leg after trimming 176 dps. Signs of chronic lameness indicated by widening of white line and blood stained sole horn of lateral claw. **L)** Multiple mature *Besnoitia* brood cysts in the laminae corpus displaying laminar epidermal infoldings (sample taken at microscopy). **M)** Multiple mature *Besnoitia* brood cysts in the laminae corpus displaying laminar epidermal infoldings (sample taken at microscopy).

Figura 2: Pontuação de locomoção de bovinos (Zinpro®)



Figura 3: Sinais mais observados por MV (Waap et al. 2014)

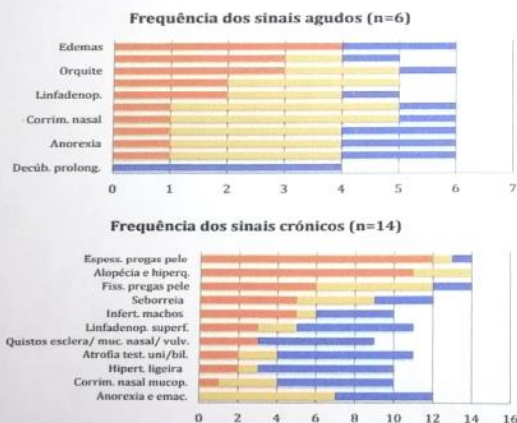


Figura 4: CC (Rebhun's Diseases of Dairy Cattle)



Pontuação dos sinais clínicos:

- Alterações dermatológicas (0-3):** 0- Sem alterações; 1-Irregularidades e liquenificação ligeiras; 2- Irregularidades e lesões moderadas; 3- Espessamento e alopecia evidentes; *- Com edema
- Alterações dermatológicas ubere (0-3):** 0- Sem alterações; 1- Lesões ligeiras; 2- Irregularidades e lesões moderadas; 3- Irregularidades e lesões evidentes
- Locomoção/Claudicação (1-5):** de acordo com a figura 2
- Condição corporal (CC) (1-5):** de acordo com a figura 4
- Linfoadenomegália (Ln):** Presente (✓) / Ausente (x)
- Corrimento nasal e ocular:** Ausente (x) / Seroso (S) / Mucoso (M) / Purulento (P)
- Quistos:** Presente (✓) / Ausente (x)